

**ALESSANDRA EMANUELE TONIETTO**

**ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE COBRE E ZINCO NAS ÁGUAS DO  
RESERVATÓRIO DO IRAÍ: EFEITOS DA MATÉRIA ORGÂNICA  
E INTERAÇÃO COM MICROALGAS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química. Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadores:

Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Teresa Lombardi

**Fevereiro de 2006**

## AGRADECIMENTOS

- ❖ À minha mãe Léa, às minhas irmãs Lucy, Leila e Mariléia, ao meu cunhado Wilson, e aos meus sobrinhos Adele, Aline, Gustavo, Karina, Felipe, Andressa e Nicole pelo amor, amizade, ensinamentos e apoio incondicional dedicados a mim durante a minha vida.
- ❖ Ao meu orientador, Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi, pela oportunidade de realizar este projeto de Mestrado e orientação durante o trabalho.
- ❖ À minha co-orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Teresa Lombardi, pelo apoio, amizade e orientação durante o trabalho.
- ❖ Aos Professores, Dr. Patricio Peralta-Zamora e Dr. André Henrique Rosa, por aceitarem participar da banca de defesa desta dissertação de Mestrado.
- ❖ Ao Prof. Dr. Patricio Peralta-Zamora pelo apoio, amizade e auxílio na Análise de Componentes Principais.
- ❖ À Sanepar, especialmente ao Márcio Borkoski, que autorizou a realização das coletas mensais no Reservatório do Iraí e à Cláudia Vítoli pela identificação das microalgas.
- ❖ Ao Núcleo Interdisciplinar de Meio Ambiente e Desenvolvimento (NIMAD) pelo empréstimo do analisador de água.
- ❖ Ao Prof. Dr. Michael Twiss que gentilmente nos emprestou o FluoroProbe.
- ❖ À Matilte Halma pela amizade, confiança, incentivo e integridade.
- ❖ À Elizabeth Weindarth Scheffer pela amizade, confiança, incentivo, companhia nas viagens aos Congressos, ajuda em todas as coletas e participação na produção do vídeo de técnicas limpas no Reservatório do Iraí.

- ❖ À Gilcélia A. Cordeiro pela amizade, alegria e apoio, além do auxílio na análise de PCA e pela participação na produção do vídeo das minhas coletas de água no Reservatório do Iraí.
- ❖ À Marianna Basso Jorge (CEM - UFPR) pela dedicação nos cultivos das microalgas.
- ❖ À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thelma Veiga (Departamento de Botânica - UFPR) e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Célia Sant'ana (Instituto de Botânica IBT - SP) pela identificação das microalgas.
- ❖ À Adriane Freitas pela disposição ao ajudar-me na parte biológica do meu trabalho e pela obtenção das imagens das microalgas.
- ❖ À Clarisse B. S. Roepcke, Cristiane Knoerr e Paulo V. Farago pela obtenção das imagens das microalgas.
- ❖ Ao Fernando F. Sodré, Vanessa E. dos Anjos e Ellen Prestes pelo apoio e ensinamentos práticos no laboratório no início do trabalho e, principalmente, à Vanessa, pelas análises de carbono orgânico dissolvido.
- ❖   Carla Sirtori pela amizade, apoio e companheirismo.
- ❖ Aos demais colegas do grupo de pesquisa e do LabQAM, ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFPR e aos funcionários do Departamento de Química da UFPR que contrib iram para a realização deste trabalho.
- ❖   Fundação Araucária, CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro.
- ❖ às Professoras do Centro Estadual de Educação Básica para Jovens e Adultos (CEEBJA - SESI/CIC), M rcia L. Dudeque, Carla Chandelier, Walliana Takasaki e Margarete de Souza pela amizade, compreensão, apoio e incentivo para que eu pudesse realizar esta dissertação, permitindo conciliá-la às minhas atividades profissionais como professora na escola, durante o período noturno.

- ❖ Às minhas amigas: Paula R. Gebara, Maria Luiza S. Fontes, Patrícia C. Wasilewski, Juliana O. Furlan e Priscilla Lima pelo apoio, confiança e amizade de muitos anos.

## RESUMO

Neste trabalho foram avaliados o comportamento e a dinâmica dos metais cobre e zinco nas águas do Reservatório do Iraí, localizado na Região Metropolitana de Curitiba (RMC). Foram realizadas coletas mensais, durante um ano, como forma de avaliar a especiação física e química dos metais cobre e zinco e sua interação com a matéria orgânica dissolvida, envolvendo excretados de *Chlorella* sp., isolada do reservatório. Por meio da determinação dos parâmetros carbono orgânico dissolvido, sólidos suspensos totais, cloreto, oxigênio dissolvido e alcalinidade, não foi evidenciado um grau elevado de aporte de esgoto nas águas do reservatório devido ao processo de urbanização, mas suas águas sofrem freqüentemente um processo de florescimento de microalgas, fato que foi confirmado através dos valores de clorofila-a de até  $34 \mu\text{g L}^{-1}$ . Os resultados desse trabalho permitiram concluir que o reservatório é um local com elevado nível de eutrofização.

As frações total recuperável e dissolvida dos metais foram determinadas através da Espectrometria de Absorção Atômica com forno de grafite (EAA-FG). Em média, as concentrações de zinco total ( $65,77 \text{ nmol L}^{-1}$ ) sempre foram superiores às de cobre ( $20,43 \text{ nmol L}^{-1}$ ). Além disso, o cobre foi o metal que apresentou maior afinidade ao material particulado em suspensão. Enquanto cerca de 83% do cobre se encontraram presentes na fração dissolvida, aproximadamente 88% do zinco se apresentaram em solução.

Neste trabalho foi desenvolvido um protocolo analítico para determinação da especiação de ambos os metais utilizando a Voltametria de Redissolução Anódica (VRA). Por meio de titulações voltamétricas, realizadas separadamente para cada metal, foi possível determinar a concentração dos metais na forma lábil, obtendo-se concentrações médias da ordem de  $3,0$  e  $14 \text{ nmol L}^{-1}$  e complexada da ordem de  $14$  e  $44 \text{ nmol L}^{-1}$  para cobre e zinco, respectivamente. Aplicando-se o método de Linearização de Ruzic foram avaliadas as características de complexação da amostra, ou seja, a concentração de sítios disponíveis ( $[L]_{\text{TOTAL}}$ ) e o valor da constante de estabilidade condicional ( $K$ ) para ambos os metais. Esta

avaliação apresentou resultados distintos para os metais cobre e zinco. Enquanto o cobre mostrou-se mais fortemente complexado à matéria orgânica, apresentando para a constante de estabilidade condicional ( $\text{Log } K'$ ) valores médios em torno de 8,0, o zinco apresentou maiores concentrações de sítios disponíveis para complexação, em média  $258 \text{ nmol L}^{-1}$ . Posteriormente à obtenção destes dados, determinou-se os valores dos metais na forma iônica livre, com o uso do programa de equilíbrio químico MineqL+, que resultou em valores médios de  $1,0 \text{ nmol L}^{-1}$  para o cobre e  $15 \text{ nmol L}^{-1}$  para zinco.

Também foi avaliada a competição entre cobre e zinco pelos sítios de complexação disponíveis na amostra de água natural. Os resultados mostraram uma forte tendência de ocupação pelo cobre dos sítios originalmente preenchidos pelo zinco. Em contrapartida, ficou evidenciado que o zinco não compete com o cobre pelos sítios de complexação.

Os dados obtidos durante o período anual de amostragem foram avaliados através da Análise de Componentes Principais (PCA). Este estudo demonstrou que há múltiplas possibilidades de se avaliar o comportamento dos metais, sugerindo algumas tendências que relacionaram os resultados das análises de uma maneira bastante clara, objetiva e satisfatória.

Após o desenvolvimento de culturas das microalgas coletadas e isoladas a partir do reservatório, estas foram filtradas e tituladas para avaliar a capacidade de complexação dos excretados das microalgas. O comportamento dos metais frente aos excretados foi similar ao obtido nas águas do Reservatório do Iraí, apresentando valores médios em torno de 8,0 e 7,5 para o  $\text{Log } K'$  e concentrações de sítios disponíveis na ordem de  $90 \text{ nmol L}^{-1}$  e  $268 \text{ nmol L}^{-1}$  para cobre e zinco, respectivamente. Também foi realizada a titulação de competição entre cobre e zinco por sítios disponíveis nos excretados. Os resultados frente à capacidade de complexação dos metais nos excretados foi similar àqueles obtidos nas águas do reservatório, mas os metais não indicaram competição por sítios presentes nos excretados, sugerindo a existência de sítios específicos de complexação para cada um dos metais, neste material.

## ABSTRACT

The behavior and dynamics of copper and zinc at the Iraí Reservoir, located in the Metropolitan Region of Curitiba (RMC), was investigated in this work were evaluated. Samples were collected monthly, for an year, and the geochemical speciation of the aforementioned metals as well as their interaction with the dissolved organic matter, including microalgae exudates, was evaluated. Through the determination of parameters such as dissolved organic carbon, total suspended solids, dissolved chlorides, dissolved oxygen and total alkalinity, we collect evidences suggesting that the reservoir does not receive heavy contaminant discharges. However, the systematic determination of chlorophyll-a throughout an hydrological cycle, which showed a maximum value of  $34 \mu\text{g L}^{-1}$ , confirmed that the reservoir is an eutrophic water body.

The total dissolved and recoverable fractions of copper and zinc were determined using Atomic Absorption Spectrometry couples with a Graphite Furnace. Average concentration for total zinc was  $65.77 \text{ nmol L}^{-1}$  and they were always than copper concentrations, which presented an average value of  $20.43 \text{ nmol L}^{-1}$ . Furthermore, copper was the metal that presented higher affinity to the particulated matter. While about 83% of copper was found in the dissolved fraction, approximately 88% of the zinc was determined in the same fraction.

An analytical protocol for the determination of the speciation of both metals, based upon anodic stripping voltammetry measurements was also developed in this dissertation. Using a series of independent voltammetric titrations, it was possible to determine labile and complexed metal concentrations. Average concentrations were 3.0 and  $14 \text{ nmol L}^{-1}$  while mean complexed concentrations were 14 and  $44 \text{ nmol L}^{-1}$  for copper and zinc, respectively. Titration data were submitted to the Ruzic model and we evaluated the complexation characteristics of copper and zinc, through the determination of the conditional stability constant ( $K'$ ) and total ligand concentration ( $[\text{L}]_{\text{TOTAL}}$ ) considering the existence of one complexation site. While copper showed to be strongly complexed to the organic matter, presenting  $\text{Log } K'$  average values of 8.0, the dissolved organic matter

presented higher available  $[L]_{\text{TOTAL}}$  for zinc averaging  $258 \text{ nmol L}^{-1}$ . Free copper and zinc concentrations were also estimated by means of the MineqL+ speciation model, resulting in average values of  $1.0 \text{ nmol L}^{-1}$  for copper and  $15 \text{ nmol L}^{-1}$  for zinc.

The competition between copper and zinc by available complexing sites was also evaluated. The results showed that copper replaces zinc when water samples were titrated with the former. By the other hand, the titrations revealed that zinc was not able to compete with copper for the available sites.

All data obtained during the annual period of study was also evaluated by Principal Component Analysis (PCA). Most of the conclusions drawn throughout the univariate analyses were confirmed by PCA.

Microalgae exudates extracted from a culture developed at the laboratory were also titrated in order to evaluate copper and zinc complexation characteristics. These characteristics were similar to those obtained with the titration of exudates from the lake water. Log  $K'$  values were 8.0 for copper and 7.5 for zinc. In addition,  $[L]_{\text{TOTAL}}$  values were  $90 \text{ nmol L}^{-1}$  and  $268 \text{ nmol L}^{-1}$  for copper and zinc, respectively. However, there was no evidence of competition between copper and zinc for the available complexing sites. These results suggest that the exudates are able to provide specific sites for the complexation of both metals.



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
1.1	Importância da Especiação dos Metais .....	24
1.2	Técnicas Analíticas para Avaliação da Especiação de Metais .....	30
1.3	Interações entre Metais, Matéria Orgânica Dissolvida e Microalgas .....	52
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>56</b>
<b>3</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>57</b>
3.1	Ponto de Amostragem.....	57
3.2	Técnicas Limpas.....	59
3.3	Coleta das Amostras .....	61
3.4	Digestão das Amostras .....	62
3.5	Especiação de Cobre e Zinco .....	62
3.6	Determinação da Capacidade de Complexação dos Metais Cobre e Zinco nas Águas do Reservatório do Iraí .....	64
3.7	Titulação de Competição entre os Metais Cobre e Zinco nas Águas do Reservatório do Iraí .....	67
3.8	Determinação da Capacidade de Complexação de Cobre e Zinco nos Excretados das Microalgas.....	68
3.9	Titulação de Competição entre os Metais Cobre e Zinco nos Excretados das Microalgas.....	68
3.10	Determinação da Concentração de Clorofila-a.....	69
3.11	Cultura de Microalgas.....	72
3.12	Análises Complementares.....	75
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>77</b>
4.1	Avaliação das Características das Águas do Reservatório do Iraí .....	77
4.2	Otimização da Metodologia para Determinação de Cobre e Zinco por Voltametria de Redissolução Anódica .....	87
4.3	Especiação Química dos Metais Cobre e Zinco.....	93
4.4	Comportamento de Cobre e Zinco nas Águas do Reservatório do Iraí ...	100

4.5	Avaliação do Comportamento e Dinâmica dos Metais Cobre e Zinco Empregando Análise Multivariada (PCA).....	110
4.6	Competição entre os Metais Cobre e Zinco por Sítios de Ligação Disponíveis nas Águas do Reservatório .....	126
4.7	Classificação das Microalgas do Reservatório .....	134
4.8	Avaliação do Comportamento da Capacidade de Complexação dos Excretados de Microalgas Frente aos Metais Cobre e Zinco.....	137
4.9	Competição dos Metais Cobre e Zinco por Sítios de Ligação Disponíveis nos Excretados das Microalgas .....	142
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>146</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>151</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema representativo da distribuição de metais em águas naturais. Adaptado a partir de Twiss *et al.* (2001)..... 25
- Figura 2.** Esquema representativo do tempo de escala difusional e dimensões espaciais para a gama de processos ambientais e sensores analíticos. .... 31
- Figura 3.** Diagrama esquemático representativo da técnica analítica para especiação denominada Gradiente Difusivo em Filmes Finos, *DGT*. M: metal; MY: complexo lipofílico; ML: complexo transportado através da membrana;  $k_a$ : constante de velocidade de associação do complexo;  $k_d$ : constante de velocidade de dissociação;  $K$ : constante de equilíbrio;  $\delta_g$ : espessura da camada de gel;  $\delta_s$ : espessura da camada difusional da solução;  $D$ : coeficiente de difusão..... 41
- Figura 4.** Diagrama representando a técnica analítica para especiação denominada Microeletrodo Integrado a Gel, *GIME*. M: metal; MY: complexo lipofílico; ML: complexo transportado através da membrana;  $k_a$ : constante de velocidade de associação do complexo;  $k_d$ : constante de velocidade de dissociação;  $K$ : constante de equilíbrio;  $\delta_g$ : espessura da camada de gel..... 43
- Figura 5.** Diagrama representando a técnica analítica para especiação Permeação em Membrana Líquida, *PLM*.  $k_a$ : constante de velocidade de associação do complexo;  $k_d$ : constante de velocidade de dissociação;  $K$ : constante de equilíbrio;  $\delta_s$ : espessura da camada difusional da solução;  $\delta_m$ : espessura da membrana;  $D$ : coeficiente de difusão; M: metal; MY: complexo lipofílico; ML: complexos que contribuem para acumulação no sensor; MS: metal ligado a solução receptora; MC: metal ligado ao carregador; C: carregador orgânico. 45
- Figura 6.** Diagrama representando a técnica analítica para especiação Técnica de Membrana de Donnan, *DMT*. M: metal; MY: complexo lipofílico; ML: complexos que contribuem para acumulação no sensor;  $k_a$ : constante de velocidade de associação do complexo;  $k_d$ : constante de velocidade de dissociação;  $K$ : constante de equilíbrio;  $D$ : coeficiente de difusão. .... 47

<b>Figura 7.</b> Representação generalizada de processos químicos de difusão nos microorganismos. $K_{int}$ : constante de velocidade de internalização; M: metal; MY: complexo lipofílico; ML: complexos que contribuem para acumulação no sensor; $k_a$ : constante de velocidade de associação do complexo; $k_d$ : constante de velocidade de dissociação; $K$ : constante de equilíbrio; $\delta g$ : espessura da camada de gel; $D$ : coeficiente de difusão. ....	48
<b>Figura 8.</b> Representação esquemática da localização geográfica do Reservatório do Iraí na Região Metropolitana de Curitiba. ....	57
<b>Figura 9.</b> Imagem de satélite do local de coleta das amostras de água no Reservatório do Iraí (Google Earth). ....	58
<b>Figura 10.</b> Fotografias do Reservatório do Iraí e local de amostragem – final do trapiche; <b>(a)</b> nível mais elevado de água; <b>(b)</b> nível mais baixo de água observado. ....	59
<b>Figura 11.</b> Fluxograma do procedimento analítico adotado para a determinação da especiação dos metais cobre e zinco nas águas naturais do Reservatório do Iraí. ....	63
<b>Figura 12.</b> Fotografias do FluoroProbe, equipamento empregado na determinação da concentração de clorofila-a e classificação de diferentes espécies de fitoplânctons <i>in situ</i> ; <b>(a)</b> visão geral do equipamento; <b>(b)</b> medida <i>in situ</i> realizada nas águas do Reservatório do Iraí. ....	71
<b>Figura 13.</b> Fotografias <b>(a)</b> da passagem da rede de fitoplâncton nas águas do reservatório; <b>(b)</b> da rede contendo microlagas coletadas no Reservatório do Iraí em agosto/2004. ....	72
<b>Figura 14.</b> Teores de sólidos suspensos totais nas águas do reservatório e nível das águas durante os meses de junho de 2004 a maio de 2005. ....	80
<b>Figura 15.</b> Espectros obtidos para a clorofila-a (___) extraída das microalgas do reservatório, controle do filtro de fibra de vidro (___) e controle empregando acetona (___). ....	82
<b>Figura 16.</b> Valores de clorofila-a, carbono orgânico dissolvido (COD) e sólidos em suspensão (SST) nas águas do reservatório, durante o período de amostragem. ....	83

<b>Figura 17.</b> Variação da clorofila-a em função dos sólidos suspensos totais durante o período de amostragem. ....	84
<b>Figura 18.</b> Fotografia do Reservatório do Iraí tirada em novembro de 2005, mostrando uma situação de florescimento massivo de microalgas. ....	86
<b>Figura 19.</b> Voltamogramas referentes à adição de padrões de cobre e zinco a uma solução contendo $4,95 \mu\text{g L}^{-1}$ destes metais. Parâmetros da análise voltamétrica: Edep: $-1,2 \text{ V}$ (vs Ag/AgCl); Ei: $-1,2 \text{ V}$ e Ef: $0,15 \text{ V}$ ; tdep: $300 \text{ s}$ ; amplitude do pulso: $50 \text{ mV}$ ; velocidade de varredura: $8 \text{ mV s}^{-1}$ ; purga entre as adições: $180 \text{ seg.}$ <b>(a)</b> eletrólito de suporte: HCl; <b>(b)</b> eletrólito de suporte: $\text{HNO}_3$ . ....	90
<b>Figura 20.</b> Voltamogramas referentes às titulações da amostra de água do Reservatório do Iraí. <b>(a)</b> Titulação com $\text{Cu}^{2+}$ ( $500 \mu\text{g L}^{-1}$ ); <b>(b)</b> titulação com $\text{Zn}^{2+}$ ( $500 \mu\text{g L}^{-1}$ ). I: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{KNO}_3$ ; Edep: $-1,2 \text{ V}$ (vs Ag/AgCl); $\text{Cu}^{2+}$ : Ei: $-0,6 \text{ V}$ e Ef: $0,15 \text{ V}$ ; $\text{Zn}^{2+}$ : Ei: $-1,2 \text{ V}$ e Ef: $-0,6 \text{ V}$ ; tdep: $600 \text{ s}$ ; amplitude do pulso: $50 \text{ mV}$ ; velocidade de varredura: $8 \text{ mV s}^{-1}$ ; purga entre as adições: $180 \text{ seg.}$ ; tempo de equilíbrio: $20 \text{ min.}$ ....	96
<b>Figura 21.</b> Determinação das capacidades de complexação, baseada na Linearização de Ruzic, da amostra de água do Reservatório do Iraí. <b>(a)</b> cobre; <b>(b)</b> zinco. ....	98
<b>Figura 22.</b> <b>(a)</b> Valores de cobre (●) e zinco (□) total recuperável durante o período de amostragem, nas águas do reservatório; <b>(b)</b> Valores da porcentagem de cobre (●) e zinco (□) na fração dissolvida em função do período de amostragem, nas águas do Reservatório do Iraí. ....	102
<b>Figura 23.</b> Coeficientes de partição (KD) do cobre (●) e zinco (□) em função dos teores de sólidos suspensos totais para as águas do Reservatório do Iraí, durante o período de amostragem. ....	104
<b>Figura 24.</b> <b>(a)</b> Concentrações de sítios disponíveis para o cobre (●) e zinco (□); <b>(b)</b> Valores de $\text{Log } K'$ para os mesmos metais em função das amostras coletadas mensalmente. ....	106

<b>Figura 25.</b> Concentrações de cobre (●) e zinco (□) complexados em função das suas respectivas concentrações na fração dissolvida.....	108
<b>Figura 26. (a)</b> Concentrações dos metais cobre (●) e zinco (□) complexados (CuL e ZnL) em função do teor de carbono orgânico dissolvido; <b>(b)</b> Variação da capacidade de complexação ([L]TOTAL) destes metais em função do carbono orgânico dissolvido para as águas do reservatório. ....	109
<b>Figura 27.</b> Gráfico de autovalores para cada componente principal e variância explicada. ....	115
<b>Figura 28.</b> Loadings entre as componentes principais <b>(a)</b> 1, <b>(b)</b> 2 e <b>(c)</b> 3 e os valores dos pesos. ....	117
<b>Figura 29.</b> Gráficos de <b>(a)</b> escores e <b>(b)</b> pesos para as componentes principais 1 e 2 geradas através da análise multivariada dos dados.....	120
<b>Figura 30.</b> Gráficos de <b>(a)</b> escores e <b>(b)</b> pesos para as componentes principais 1 e 3 geradas através da análise multivariada dos dados.....	123
<b>Figura 31.</b> Voltamogramas referentes às competições de cobre e zinco na amostra de água do Reservatório do Iraí. <b>(a)</b> Adição de Zn <sup>2+</sup> e titulação com Cu <sup>2+</sup> (500 µg L <sup>-1</sup> ); <b>(b)</b> Adição de Cu <sup>2+</sup> e titulação com Zn <sup>2+</sup> (500 µg L <sup>-1</sup> ). I: 0,1 mol L <sup>-1</sup> em KNO <sub>3</sub> ; Edep: -1,2 V (vs Ag/AgCl); Cu <sup>2+</sup> : Ei: -0,6 V e Ef: 0,15 V; Zn <sup>2+</sup> : Ei: -1,2 V e Ef: -0,6 V; tdep: 600 s; amplitude do pulso: 50 mV; velocidade de varredura: 8 mV s <sup>-1</sup> ; purga entre as adições: 180 seg.; tempo de equilíbrio: 20 min. ....	127
<b>Figura 32.</b> Imagens da cultura das microalgas <b>(a)</b> e <b>(b)</b> aumentada 100 vezes; <b>(c)</b> aumentada 40 vezes. ....	136
<b>Figura 33.</b> Voltamogramas referentes às titulações dos excretados das microalgas. <b>(a)</b> Titulação com Cu <sup>2+</sup> (500 µg L <sup>-1</sup> ); <b>(b)</b> titulação com Zn <sup>2+</sup> (500 µg L <sup>-1</sup> ). I: 0,1 mol L <sup>-1</sup> em KNO <sub>3</sub> ; Edep: -1,2 V (vs Ag/AgCl); Cu <sup>2+</sup> : Ei: -0,6 V e Ef: 0,15 V; Zn <sup>2+</sup> : Ei: -1,2 V e Ef: -0,6 V; tdep: 600 s; amplitude do pulso: 50 mV; velocidade de varredura: 8 mV s <sup>-1</sup> ; purga entre as adições: 180 seg.; tempo de equilíbrio: 20 min. ....	138

**Figura 34.** Determinação das capacidades de complexação, baseada na Linearização de Ruzic, dos excretados das microalgas. **(a)** cobre; **(b)** zinco.

..... 139

**Figura 35.** Curva de titulação referente à competição entre os metais cobre e zinco; **(a)** Adição de  $Zn^{2+}$  e titulação com  $Cu^{2+}$  ( $500 \mu g L^{-1}$ ); **(b)** Adição de  $Cu^{2+}$  e titulação com  $Zn^{2+}$  ( $500 \mu g L^{-1}$ ). I:  $0,1 mol L^{-1}$  em  $KNO_3$ ; Edep:  $-1,2 V$  (vs Ag/AgCl);  $Cu^{2+}$  : Ei:  $-0,6 V$  e Ef:  $0,15 V$ ;  $Zn^{2+}$  : Ei:  $-1,2 V$  e Ef:  $-0,6 V$ ; tdep:  $600 s$ ; amplitude do pulso:  $50 mV$ ; velocidade de varredura:  $8 mV s^{-1}$ ; purga entre as adições:  $180 seg.$ ; tempo de equilíbrio:  $20 min.$ ..... 143

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros utilizados para a titulação da capacidade de complexação dos metais cobre e zinco.....	64
<b>Tabela 2.</b> Composição do meio de cultura WC, sem EDTA, usado nos bioensaios (Guillard e Lorenzen, 1972).....	74
<b>Tabela 3.</b> Valores mínimos e máximos, médios e medianos para os parâmetros aquáticos determinados no Reservatório do Iraí, durante o período mensal de amostragem (junho de 2004 a maio de 2005).....	78
<b>Tabela 4.</b> Classificação e valores de concentrações fitoplanctônicas e de clorofila-a medidas <i>in situ</i> no Reservatório do Iraí e concentração de clorofila-a determinada no laboratório. ....	85
<b>Tabela 5.</b> Teste de recuperação para cobre e zinco em uma solução contendo aproximadamente 5,0 µg L <sup>-1</sup> dos metais, utilizando diferentes eletrólitos. ....	91
<b>Tabela 6.</b> Valores de concentração de cobre (nmol L <sup>-1</sup> ), e distribuição deste metal nas frações recuperável, dissolvida, complexada, lábil e livre nas águas do Reservatório do Iraí.....	101
<b>Tabela 7.</b> Valores de concentração de zinco (nmol L <sup>-1</sup> ), e distribuição deste metal nas frações recuperável, dissolvida, complexada, lábil e livre nas águas do Reservatório do Iraí.....	101
<b>Tabela 8.</b> Parâmetros utilizados na análise de componentes principais.....	114
<b>Tabela 9.</b> Variância capturada, em termos percentuais, para cada componente principal durante a análise multivariada. ....	116
<b>Tabela 10.</b> Valores de cobre e zinco total recuperável e dissolvido e parâmetros de complexação da amostra de água do Reservatório do Iraí. ....	126
<b>Tabela 11.</b> Concentrações de cobre e zinco total dissolvido e parâmetros obtidos através da determinação da capacidade de complexação realizada nos excretados.....	140
<b>Tabela 12.</b> Valores de cobre e zinco total dissolvido e recuperável determinados nos excretados e parâmetros obtidos através do experimento de	



determinação da capacidade de complexação na titulação dos excretados com os mesmos metais.....	142
---	-----

<b>Tabela 13.</b> Valores de cobre e zinco adicionados nos excretados para realizar a titulação e parâmetros obtidos através da determinação da capacidade de complexação da competição entre os metais cobre e zinco por sítios disponíveis nos excretados. ....	145
---	-----

## SIGLAS E ACRÔNIMOS<sup>1</sup>

APA	Área de proteção ambiental
APHA	American Public Health Association
BLM	Modelo do ligante biótico (do inglês <i>Biotic Ligand Model</i> )
CEM	Centro de Estudos do Mar – UFPR (Pontal do Paraná)
CLE-AdSV	Troca por ligante de competição – voltametria de redissolução adsortiva
COD	Carbono orgânico dissolvido
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CP	Componente principal
CPs	Componentes principais
Cu <sup>2+</sup>	Cobre iônico livre
CuL	Cobre complexado
CuTD	Cobre total dissolvido
CuTR	Cobre total recuperável
DGT	Gradientes difusivos em filmes finos
DMT	Técnica de membrana Donnan
E (V)	Potencial
EAA-FG	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite
ECP	Efeito de concentração de partículas
E <sub>dep</sub>	Potencial de deposição
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
E <sub>i</sub>	Potencial inicial
E <sub>f</sub>	Potencial final
EN	Etilenodiamina
EUA	Estados Unidos da América
FIAM	Modelo da atividade do íon livre (do inglês <i>Free Ions Activity Model</i> )

---

<sup>1</sup> Acrônimos e siglas foram empregados, nesta dissertação, de maneira a respeitar a forma como têm sido utilizados pela comunidade química brasileira. As siglas foram traduzidas naqueles casos onde existem normas ou consenso em relação ao seu uso na língua portuguesa. Nos demais casos, foram mantidos os termos originais em inglês.

GIME	Microeletrodo integrado a gel
I (nA)	corrente (nano ampere)
I	Força iônica
ISE	Eletrodo íon-seletivo
$K_{ML}$	Constante de estabilidade condicional
$K_D$	Coeficiente de partição
$[L]_{TOTAL}$	Concentração total de ligantes disponíveis
L	Ligantes disponíveis
$[M]_{TOTAL}$	Concentração total do metal
$[M']$	Concentração do metal na forma lábil
$[ML]$	Concentração do metal na forma complexada
M	Metal
$M_{lab}$	Metal lábil
$M^{2+}$	Metal livre
ML	Complexo (metal-ligante)
MOD	Matéria orgânica dissolvida
MTD	Metal total dissolvido
MTR	Metal total recuperável
NTA	Ácido nitrilotriacético
OD	Oxigênio dissolvido
PCA	Análise de componentes principais (do inglês <i>Principal Component Analysis</i> )
PLM	Membrana líquida de permeação
RMC	Região Metropolitana de Curitiba
rpm	Rotações por minuto
SHA	Substâncias húmicas aquáticas
SST	Sólidos suspensos totais
T	Temperatura
$T_{ag}$	Temperatura da água
$T_{amb}$	Temperatura ambiente

$t_{\text{dep}}$	Tempo de deposição
U.S. EPA	United States Environmental Protection Agency
UV-vis	Ultravioleta-visível
VRA	Voltametria de redissolução anódica
VRAPD	Voltametria de redissolução anódica com pulso diferencial
VRC	Voltametria de redissolução catódica
VRCPD	Voltametria de redissolução catódica com pulso diferencial
VR	Voltametria de redissolução
$\text{Zn}^{2+}$	Zinco iônico livre
ZnL	Zinco complexado
ZnTD	Zinco total dissolvido
ZnTR	Zinco total recuperável
$\lambda$	comprimento de onda

## 1 INTRODUÇÃO

Todas as formas de vida são afetadas pela presença de metais, os quais diferem das outras substâncias potencialmente tóxicas pelo fato de não serem produzidos ou destruídos pelo homem. Na década de oitenta, no século XX, a mobilização destes contaminantes para a biosfera já tinha alcançado valores bastante preocupantes (Nriagu e Pacyna, 1988).

Em águas naturais, os metais traço estão presentes em diferentes formas químicas. Sua biodisponibilidade para diferentes organismos aquáticos é fortemente dependente destas formas (Ruzic, 1996) e dependendo da concentração e do grau de complexação, o metal pode limitar o crescimento ou ser tóxico para organismos vivos (Meylan *et al.*, 2004).

Os metais estão originalmente distribuídos no ambiente em razão dos ciclos biogeoquímicos da matéria. O intemperismo dissolve rochas, podendo transportar metais para rios e lagos, solos adjacentes e oceanos. Os ciclos biológicos incluem a bioacumulação e a biomagnificação, os quais transformam teores normais em concentrações tóxicas, para diferentes espécies da biota e para o próprio homem (Goyer, 1996; Tavares e Carvalho, 1992).

Além desses aspectos, a atividade industrial diminui significativamente o tempo de permanência natural de um metal na natureza, particularmente na forma de minérios, motivando a produção de novos compostos e alterando, conseqüentemente, a distribuição desses elementos no planeta (Nriagu, 1990). A deposição atmosférica, através das precipitações úmida e seca, também se constitui em importante fonte natural de metais pesados. Em função do aumento crescente da poluição do ar, dois efeitos têm se tornado bastante aparentes. Primeiramente, os dias atuais têm presenciado um aumento global no aporte de metais pesados a partir da atmosfera, principalmente em áreas urbanas e industriais. O segundo efeito está relacionado ao aumento da acidez das águas de chuva, que tem contribuído para uma aceleração no processo de lixiviação provocado pelo intemperismo.

A descarga de metais pesados em corpos aquáticos receptores pode promover alterações significativas nos comportamentos físico, químico e biológico, tanto do corpo receptor (Vega *et al.*, 1998), como do próprio metal (Velásquez *et al.*, 2002; Witters, 1998). Essas alterações podem ser divididas em duas amplas categorias: (i) efeito do ambiente sobre o metal, e (ii) efeito do metal sobre o ambiente. A primeira categoria enfatiza condições nas quais as águas receptoras podem influenciar o comportamento e a toxicidade dos metais. Tais condições incluem a distinção da entrada de material antropogênico e geoquímico, qualidade dos efluentes domésticos e industriais, concentração de ligantes e teores de sólidos suspensos. O efeito do metal na resposta biológica é enfatizado na segunda categoria. Dependendo das condições ambientais, o metal pode variar a densidade, a diversidade, a estrutura da comunidade e a composição das espécies de populações. O grau de variação dependerá amplamente da concentração de metais na água e, igualmente, no sedimento. As mudanças nas características do meio aquático pelo aporte de espécies metálicas antropogênicas podem provocar efeitos deletérios à biota aquática. Considerando as interdependências entre organismos aquáticos, estas modificações sempre proporcionam desequilíbrios ecológicos (Hudson, 1998).

É importante considerar que um metal se encontra biodisponível para as espécies do meio quando está presente, ou pode ser convertido, em sua forma iônica livre, tornando-se capaz de ser absorvido em uma escala de tempo relevante ao desenvolvimento dos organismos vivos e, ainda, deste modo, podendo afetar seus ciclos de vida.

A distribuição, o transporte e a biodisponibilidade de metais em ambientes aquáticos são primariamente controlados pelo sedimento e pela coluna de água, respectivamente. A mobilização de metais, ou sua falta, depende da textura física e da natureza química do sedimento, na qual sua variação determina a quantidade e a força de ligação do metal. A composição físico-química da coluna de água determina os mecanismos de transporte do metal, governando sua distribuição entre as formas particulada, coloidal, iônica dissolvida e complexada dissolvida.

Geralmente, os metais-traço são persistentes, tóxicos, bioacumulativos e estão cada vez mais presentes em corpos aquáticos, em função de atividades antrópicas. Em ambientes aquáticos, metais-traço existem em solução na forma de íons hidratados livres ou complexados por ligantes orgânicos e inorgânicos. Podem ainda estar presentes na forma sólida, devido às várias associações com sedimentos e com o material particulado suspenso (Stumm e Morgan, 1996).

Os metais diferenciam-se dos compostos orgânicos tóxicos, por serem absolutamente não-degradáveis, de maneira que podem acumular-se nos componentes do ambiente onde manifestam sua toxicidade (Baird, 2002).

A maioria dos ambientes aquáticos naturais tem uma dada capacidade de reduzir os efeitos tóxicos de metais-traço devido à presença de ligantes naturais e de origem antrópica que os complexam, tornando-os menos biodisponíveis. Além disto, a adsorção de metais pelos constituintes do material particulado causa também a redução da sua toxicidade. Tal adsorção, por sua vez, também é influenciada pela presença de ligantes naturais.

Os principais compostos responsáveis pela complexação de metais são conhecidos como matéria orgânica dissolvida (MOD), como por exemplo pode-se citar as substâncias húmicas aquáticas, assim como a matéria orgânica natural recém produzida por excretados de microalgas. Tais compostos possuem importância fundamental no destino e biodisponibilidade de metais pesados em corpos aquáticos naturais.

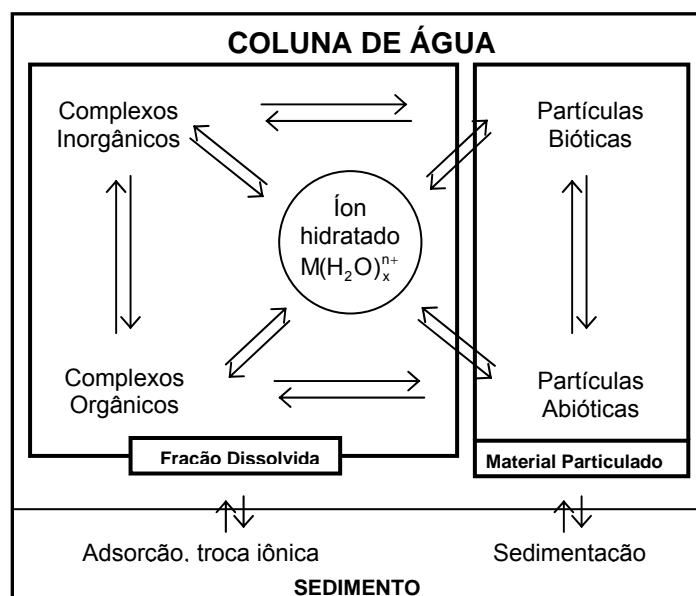
A matéria orgânica dissolvida é originária do resultado das inter-relações entre a produtividade primária (fotossíntese), do metabolismo de organismos e também de fontes externas, incluindo as contribuições antrópicas. Dentre os sistemas aquáticos naturais, os de águas correntes (rios e riachos) são os que possuem maiores produtividades primárias. Pontos de descarga de águas residuárias apresentam altíssimas taxas de produção primária, devido à disponibilidade de nutrientes (Stumm e Morgan, 1996). A formação da MOD é caracterizada pela transformação microbiológica de resíduos vegetais e animais presentes no ambiente, onde fatores ambientais e físico-químicos exercem papel fundamental.

A matéria orgânica apresenta uma composição heterogênea, que pode apresentar variações com relação à massa molar, grupos funcionais, presença e tipos de radicais livres dificultando a caracterização do modelo estrutural (Han e Thompson, 1999). Os grupos funcionais presentes nestes compostos caracterizam suas reatividades. Dentre os grupos funcionais que constituem a matéria orgânica, podemos citar os principais grupos: carboxílicos (-COOH), fenólicos (Ar-OH), aminídicos (-NH<sub>2</sub>), imidazólicos (Ar-NH), quinônicos (Ar=O), sulfidrílicos (-SH), entre outros (Perdue *et al.*, 1980). Os constituintes elementares mais importantes destas substâncias são o carbono (40-60 %), oxigênio (30-40 %) e hidrogênio (4-6 %) (Stumm, 1992).

### 1.1 Importância da Especiação dos Metais

O termo análise de especiação é definido como a avaliação da distribuição do metal entre várias formas ou espécies, ou seja, a forma na qual um metal está presente em uma dada matriz. A análise de especiação pode ser classificada de duas maneiras: análise de **especiação física** e análise de **especiação química**. A análise de especiação física distingue o metal entre as frações dissolvida, coloidal e particulada, enquanto a especiação química avalia a distribuição do metal em várias espécies químicas em solução, considerando os metais complexados ou não-complexados e a distinção entre diferentes estados de oxidação. O estudo da análise de especiação fornece informações importantes do ponto de vista ecotoxicológico, pois permite predizer uma real avaliação da presença de metais tóxicos em ambientes aquáticos, ou seja, àqueles considerados biodisponíveis (Twiss *et al.*, 2001; Twiss *et al.*, 2000). A Figura 1 apresenta de maneira geral, o comportamento do metal no ambiente aquático.





**Figura 1.** Esquema representativo da distribuição de metais em águas naturais. Adaptado a partir de Twiss *et al.* (2001).

A Figura 1 exemplifica a especiação física e química dos metais no ambiente aquático. O íon metálico pode estar associado à matéria orgânica na fração particulada ou associado a compostos orgânicos e inorgânicos na fração dissolvida. O material particulado não apresenta formas tóxicas enquanto componentes inorgânicos e íons hidratados são considerados biodisponíveis, ou seja, tóxicos à biota aquática.

Benoit *et al.* (1994) e Benoit e Rozan (1999) sugerem que a separação das frações particulada e dissolvida é questionável e dependente de condições operacionais. A espécie constituinte da fração dissolvida é aquela separada da amostra de água natural por meio da filtração em uma membrana de 0,45  $\mu m$  de porosidade (Templeton *et al.*, 2000). Segundo Florence (1982) o termo apropriado para esta fração seria “filtrável”, uma vez que colóides também são contabilizados nesta fração. Entretanto, Burba e colaboradores (1998) sugerem que, mesmo considerando que abaixo do limite de 0,45  $\mu m$  sólidos orgânicos e inorgânicos

encontram-se presentes em águas naturais, o termo “partícula” deve ser designado apenas para componentes com tamanho superior a 0,45  $\mu\text{m}$ .

Na fração particulada os metais podem ser encontrados junto a partículas orgânicas ou inorgânicas. Segundo Sigg (1998) partículas orgânicas maiores que 0,45  $\mu\text{m}$  podem surgir a partir da decomposição de organismos aquáticos ou por meio dos produtos de degradação destes organismos. Além disso, os fitoplânctons podem interagir com os metais nesta fração por meio da absorção do metal ou ainda pela formação de complexos em grupos funcionais presentes na superfície protéica celular (Sigg, 1998). Dependendo das condições naturais, os fitoplânctons podem regular a concentração de íons metálicos na coluna de água (Bruland *et al.*, 1991). Grupos carboxílicos e fosforílicos conferem à parede celular uma rede de cargas aniônicas na maioria dos ambientes aquáticos naturais e contribuem para a interação com cátions metálicos.

A adsorção de metais na fração particulada também pode ocorrer por meio da associação do metal junto ao material inorgânico. Neste caso, o metal pode ser adsorvido junto a partículas minerais tais como oxi-hidróxidos de ferro, manganês e alumínio assim como argilominerais silicatados (Harsh e Doner, 1984; Sigg, 1994; Sigg, 1998). De uma maneira geral, oxi-hidróxidos de ferro são os minerais mais abundantes em águas naturais. Por este motivo, eles desempenham um papel substancial no comportamento de metais na coluna de água (Honeyman e Santschi, 1988). Entretanto, outras partículas inorgânicas podem atuar no comportamento geoquímico de metais em águas naturais, dependendo de sua reatividade e concentração.

A distribuição de uma espécie metálica entre o material particulado em suspensão e a fração dissolvida, ou seja, sua partição exerce um papel importante na especiação de metais em águas naturais. Segundo Lu e Allen (2001), o conhecimento das condições que controlam a partição permite avaliar até que ponto uma espécie metálica pode ser transferida para uma forma potencialmente biodisponível. Assim sendo, a compreensão deste fenômeno também é importante

para o estabelecimento de padrões de qualidade de água para corpos aquáticos receptores.

Segundo Sigg (1998), os principais processos que controlam a partição de metais entre a fase sólida e aquosa são a precipitação, a troca iônica e a adsorção. A influência de cada processo sobre a partição depende do tipo de metal, das características do material em suspensão e da composição da coluna de água. Gundersen e Steinnes (2003) avaliaram a distribuição de cobre, chumbo, cádmio e alumínio entre as frações particulada, coloidal e dissolvida e observaram que, no caso do alumínio, a partição foi governada por processos de co-precipitação sendo que para os demais metais, fatores como pH e matéria orgânica controlaram a distribuição dos mesmos entre as frações particulada e dissolvida. Lu e Allen (2001) observaram que o teor de matéria orgânica, tanto na fração dissolvida quanto no material particulado governaram a partição do cobre em águas superficiais. Os autores também relataram que o pH e a concentração de sólidos em suspensão também são aspectos importantes no controle da partição.

Assim como no material particulado em suspensão, na fração dissolvida espécies metálicas podem interagir com uma variedade de ligantes naturais e antropogênicos e formar complexos estáveis e não disponíveis à biota. Nesta fração, os principais constituintes responsáveis pela complexação de metais são formados por estruturas coloidais que são contabilizadas como dissolvidas.

Em ambientes aquáticos naturais, grande parte dos componentes da fração coloidal é formada por substâncias húmicas aquáticas (SHA). Estas substâncias são os principais constituintes da matéria orgânica dissolvida e, igualmente, os principais responsáveis pela complexação de metais na fase solúvel (Cabaniss e Shuman, 1988; Zsolnay, 2003).

Uma característica importante da matéria orgânica dissolvida é a sua capacidade de formar complexos estáveis com íons metálicos. O processo de complexação de metais pode ser representado através da Equação 1, omitindo-se as cargas:



Onde M, L e ML representam as espécies do metal livre, ligante livre e complexo, respectivamente. A constante de estabilidade do complexo formado é dada como mostra a Equação 2:

$$K'_{ML} = \frac{[ML]}{[M][L]} \quad (2)$$

Os termos [M], [L] e [ML] referem-se às concentrações do metal livre, ligante livre e complexo, respectivamente.

A capacidade de complexação é definida como a concentração na qual um íon metálico pode ser adicionado a um meio aquático sem que sua forma iônica seja aquela predominante (Florence *et al.*, 1983).

Alguns autores consideram que complexos inorgânicos são biodisponíveis ou apresentam toxicidade com relação a organismos aquáticos (Mylon *et al.*, 2003). Por outro lado, metais complexados por ligantes orgânicos são considerados não-biodisponíveis. A matéria orgânica dissolvida exerce um papel fundamental na especiação de metais. Apesar dos níveis baixos de concentração em algumas águas naturais, os ligantes de natureza orgânica possuem um poder elevado de complexação. Além da avaliação da capacidade de complexação dos metais, é de grande importância a determinação da fração lábil, uma vez que, esta concentração é a considerada tóxica para o ambiente aquático.

A determinação do metal livre é importante, pois é um parâmetro chave para o estudo da reatividade, biodisponibilidade e efeitos do metal. Esta forma do metal é regulada pela interação da complexação entre metal iônico traço, ligantes e principalmente íons e partículas (Twiss, 2001).

Freqüentemente, em águas naturais, os metais encontram-se presentes na forma particulada e na grande maioria, complexados na fração dissolvida. Acredita-se que apenas uma pequena porção da concentração total esteja na forma livre ou biodisponível.

O efeito da especiação na biodisponibilidade de metais tem sido bastante estudado (Mylon *et al.*, 2003). Sabe-se, atualmente, que a fração livre do metal controla sua biodisponibilidade. Estudos recentes têm demonstrado que a toxicidade de cobre frente a peixes não está relacionada à concentração total do metal. Ao contrário, a toxicidade do metal está fortemente associada à concentração livre do mesmo (Mylon *et al.*, 2003; Xue e Sigg, 1998).

A ecotoxicidade e a mobilidade de metais pesados no ambiente, dependem fortemente de sua forma química específica e da natureza dos ligantes. Numerosos estudos têm estabelecido a importância da especiação de metais, avaliando a absorção de metais por organismos e sua toxicidade (van Hullebusch *et al.*, 2003). A especiação e toxicidade de metais têm sido investigadas através da utilização de agentes quelantes sintéticos e de ocorrência natural, águas naturais de diferentes procedências e com uma variedade de metais e organismos aquáticos.

Nos estudos realizados por Meylan e colaboradores (2003) avaliaram a acumulação de cobre por algas em resposta a mudanças na especiação do metal em águas superficiais e os autores concluíram que a concentração intracelular de cobre variou em função da forma trocável do metal, ou seja, a somatória entre as concentrações do íon livre e de complexos inorgânicos fracos. Alonso e colaboradores (2004) avaliaram as características de águas da bacia do Rio Guadiamar, na Espanha, e verificaram que alterações provocadas pelo efeito da urbanização, tais como variações nos níveis de pH, carbono orgânico dissolvido, oxigênio dissolvido e sólidos em suspensão, afetaram a especiação de metais na coluna de água.

O estudo da especiação é de grande importância, pois como afirmam Meylan e colaboradores (2004) a especiação de metais em ambientes aquáticos possui uma grande influência na biodisponibilidade dos metais. Dependendo da concentração e do grau de complexação, o metal pode limitar o crescimento ou a toxicidade de organismos vivos.

Diversos estudos evidenciam que a especiação de metais é, portanto, uma questão da maior relevância uma vez que seu conhecimento pode ter implicações diretas sobre aspectos ecotoxicológicos.

Devido à importância do conhecimento da especiação de metais em águas naturais, os padrões de qualidade de água nos Estados Unidos são baseados, há mais de uma década, na fração solúvel do metal, e não em sua concentração total (U.S. EPA, 1992; Allen e Hansen, 1996). No Brasil, apenas recentemente os padrões de qualidade de água para corpos receptores, relacionados às espécies metálicas, foram estabelecidos com base na concentração total ou solúvel do metal na coluna de água (Conama, 2005). Antes disto, os padrões de qualidade de água eram fundamentados apenas na concentração total do metal (Conama, 1986). A definição da concentração do metal na fração dissolvida como critério para avaliação da qualidade de águas é um progresso, uma vez que, esta fração está mais intimamente vinculada à biodisponibilidade do metal do que sua concentração total (Pothro, 1993 *apud* Allen e Hansen, 1996).

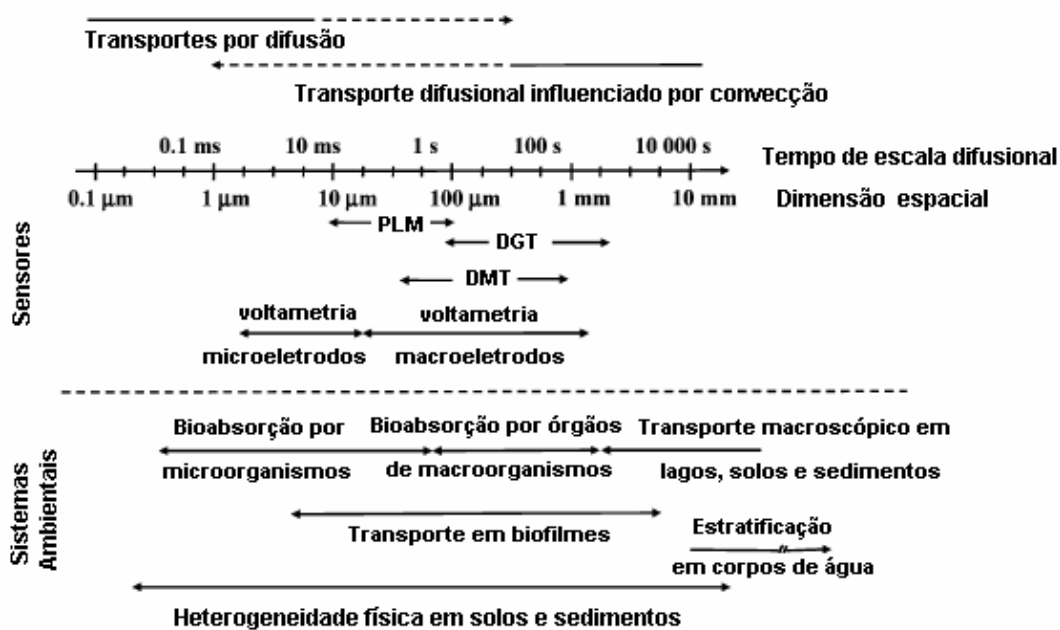
## **1.2 Técnicas Analíticas para Avaliação da Especiação de Metais**

A análise dinâmica da especiação de metais em ecossistemas aquáticos está surgindo como uma base poderosa para o desenvolvimento de previsões de biodisponibilidade e estratégias confiáveis para avaliação de riscos ambientais. Nesse contexto, um dado sensor de especiação é caracterizado por uma escala de tempo efetiva ou uma janela cinética que define as espécies metálicas mensuráveis através das suas labilidades, que por sua vez relaciona-se a biodisponibilidade (van Leeuwen *et al.*, 2005).

Geralmente, os sistemas aquáticos naturais estão sujeitos a condições variáveis e praticamente nunca estão em equilíbrio químico. Não obstante este aspecto, até o presente momento a grande maioria das abordagens experimentais e de modelagem para a especiação e relações entre biodisponibilidade e toxicidade têm desconsiderado os aspectos dinâmicos (van Leeuwen *et al.*, 2005).

O conhecimento de fatores dinâmicos torna-se assim fundamental para o estabelecimento de uma base quantitativa rigorosa para o conhecimento da efetiva relação entre a especiação de metais, biodisponibilidade e bioabsorção, e desta maneira para o estabelecimento dos fundamentos para uma avaliação dinâmica de riscos. Uma interpretação correta do destino e do impacto ambiental de complexos metálicos deve levar em conta a importância da reatividade e dos fluxos dos compostos e seu intercâmbio entre compartimentos e biota, através de processos interfaciais e das escalas relativas de tempo dos processos (van Leeuwen *et al.*, 2005).

A difusão é o processo chave no transporte, tanto para sistemas ambientais quanto para o funcionamento adequado de sensores. A Figura 2 mostra a relação entre a escala de tempo para a difusão e as dimensões chave de sistemas ambientais e de sensores.



**Figura 2.** Esquema representativo do tempo de escala difusional e dimensões espaciais para a gama de processos ambientais e sensores analíticos.

Essa escala de tempo de difusão é aquela que deve ser comparada com os tempos de reação química, por exemplo, ao discriminar entre complexos lábeis e não lábeis. Pode-se observar que pelo menos três tipos de escala de tempo estão envolvidas: (i) A escala de tempo de difusão que é relevante para o transporte de substâncias químicas sobre distâncias tipicamente da ordem de 10 a 100  $\mu\text{m}$ . Esta é a escala de tempo para transporte através de camadas de difusão em meios levemente agitados ou misturados ou através de membranas ou camadas de gel (membranas líquidas de permeação, PLM, em gradientes difusivos em filmes finos, DGT, nas técnicas correspondentes); (ii) A escala de tempo de acumulação conforme relevante para sensores com acumulação ou no caso de acumulação crônica de um poluente por um organismo ao longo de horas, dias ou mais; (iii) A escala de tempo de equilíbrio, ou seja, o tempo necessário para alcançar o equilíbrio, por exemplo, para uma amostra ambiental após a adição de um reagente ou após alteração das condições do meio, ou ainda para um sensor de especiação baseado na condição de equilíbrio (van Leeuwen *et al.*, 2005).

O estudo da especiação química de metais traço envolve a especiação de suas várias formas no ambiente aquático natural. Quanto às formas nas quais os metais podem estar complexados, podemos citar na fração dissolvida, os íons hidratados livres relativamente lábeis, e complexos inorgânicos com  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ , complexos inertes com vários ligantes orgânicos naturalmente presentes e/ou antropogenicamente introduzidos e formas particuladas associadas com colóides e frações adsorvidas incorporadas em partículas em suspensão. A biodisponibilidade e a toxicidade de metais traço como cobre, chumbo, zinco e cádmio, são principalmente controlados pela concentração do metal livre na fração dissolvida. A complexação do metal com ligantes orgânicos pode diminuir a toxicidade através da diminuição da concentração do metal iônico livre (Omanovic *et al.*, 1996).

Para a compreensão da interação de metais com a matéria orgânica dissolvida são necessários métodos analíticos para se elucidar e quantificar a extensão de tais interações. Diversos métodos são capazes de avaliar a especiação do metal, dentre eles, os métodos eletroquímicos, como redissolução



anódica, catódica e aqueles baseados na potenciometria e determinações analíticas após procedimentos de separação baseados na troca iônica, competição por ligantes, extração líquida, diálise, ultrafiltração, dentre outros. Cada técnica apresenta vantagens e desvantagens caracterizadas por suas “janelas de detecção”, que são características de cada método (Omanovic *et al.*, 1996). Tais métodos se traduzem através da determinação das constantes de estabilidade e da capacidade de complexação entre o metal e a matéria orgânica dissolvida.

A análise dinâmica da especiação fornece as melhores estimativas de bioabsorção e permite conhecer os limites de aplicabilidade dos modelos mais simples tais como o Modelo da Atividade do Íon Livre (FIAM, do inglês *Free Ions Activity Model*) e modelo do ligante biótico (BLM, do inglês *Biotic Ligand Model*), até os mais complexos. Uma dada técnica analítica irá detectar espécies com propriedades físico-químicas em um certo intervalo, como por exemplo, de tamanho, mobilidade, estabilidade, labilidade, etc.

Dentre os sensores disponíveis para análise de especiação de metais em ecossistemas aquáticos, alguns têm sinal analítico baseado em processos dinâmicos, como por exemplo o DGT, a voltametria de redissolução; ao passo que para outros está envolvida uma característica de equilíbrio, por exemplo, a técnica Donnan de membrana (DMT) ou equilíbrio difusivo em filme fino (DET). Dependendo da sua utilização, alguns sensores podem funcionar como uma base dinâmica ou de equilíbrio, tais como DMT, PLM. As técnicas dinâmicas estão baseadas na detecção do fluxo do metal e/ou do metal acumulado ao longo de um determinado período. Em sensores analíticos dinâmicos o tempo de difusão está relacionado com a difusão de espécies metálicas em solução para todas as técnicas e através de um gel (DGT), ou ainda atravessando uma membrana (PLM, DMT). O tempo de acumulação é a duração do intervalo de tempo sobre o qual o íon metálico é acumulado no eletrodo (GIME), na resina (DGT) ou nas soluções receptoras (DMT, PLM) (van Leeuwen *et al.*, 2005).

Para uma melhor compreensão das características mencionadas anteriormente, a seguir estão descritos, brevemente, os fundamentos de algumas

técnicas atuais que conferem o presente estado da arte para a teoria e aplicação de sensores dinâmicos de especiação. Uma estrutura de interpretação dinâmica comum baseada em expressões de fluxo rigorosas que incorporam os passos relevantes de difusão e reação são aplicáveis para uma família de sensores que abrangem uma ampla gama de escala de tempo.

A escolha do procedimento a ser empregado para a caracterização de uma amostra natural depende do tipo de informação a ser obtida, bem como dos recursos logísticos e operacionais disponíveis. Muitas das técnicas descritas oferecem a possibilidade de realização de determinações *in situ*, e estas determinações envolvem, geralmente, a utilização de aparelhos portáteis equipados com eletrodos específicos para a determinação de alguns parâmetros aquáticos tais como pH, condutividade, potencial redox, entre outros (Zhang e Davison, 2000). Estas técnicas têm sido relatadas para o desenvolvimento de novas tecnologias na obtenção de resultados mais elaborados, como por exemplo àqueles referentes à especiação química de metais.

### ***Voltametria***

A voltametria é uma técnica eletroquímica onde as informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química são obtidas a partir do registro de curvas corrente vs. potencial feitas durante a eletrólise dessa espécie em uma célula eletroquímica constituída de três eletrodos, sendo o eletrodo gotejante de mercúrio, denominado eletrodo de trabalho (Aleixo, 2003).

Diversos métodos voltamétricos têm sido aplicados na análise de especiação de metais. A seletividade é assegurada através de uma reação eletroquímica, mostrada na Equação 3, onde um potencial é aplicado para reduzir o íon metálico de interesse e assim, acumular a espécie metálica no eletrodo (van Leeuwen e Town, 2002).



A corrente de redução tem origem nos fluxos do íon metálico livre e dos complexos dinâmicos. Para uma sensibilidade adequada em amostras ambientais a acumulação do metal na gota é efetuada durante um período de tempo significativo, tipicamente de 10 a 20 minutos, chamado de modo de redissolução e é utilizado para quantificar o metal através de uma varredura de potencial de re-oxidação com diversos tipos de modulação, denominados Voltametria de Redissolução (VR) (do inglês *Stripping Voltametry*). Se a etapa de redissolução está envolvida com a re-oxidação de metais, ela é freqüentemente chamada de VRA, isto é, Voltametria de Redissolução Anódica (do inglês *Anodic Stripping Voltametry*). O fluxo de redução do metal, e portanto sua labilidade, depende da escala de tempo de difusão, que por sua vez pode depender do tamanho do eletrodo de trabalho. A labilidade se manifesta como um deslocamento do potencial de pico característico e para coeficientes de difusão diferentes também na magnitude do sinal analítico (van Leeuwen e Town, 2002).

Pode-se citar como exemplo a determinação de íons cobre. Inicialmente ajusta-se o potencial do eletrodo a um valor suficientemente negativo para reduzir os íons cobre a cobre metálico, que por sua vez é eletrodepositado sobre o eletrodo. A eletrólise é feita por um tempo suficiente e sob agitação constante para concentrar o cobre na superfície do eletrodo – de tamanho muito menor – a partir de um volume relativamente grande da solução. A seguir, deixa-se a solução em repouso por alguns segundos para o sistema entrar em equilíbrio (Aleixo, 2003).

Na etapa seguinte procede-se à varredura de potencial para valores mais positivos (anódicos), e o cobre é redissolvido, retornando à solução, devido à sua reoxidação. Ao ocorrer a reoxidação do cobre a corrente irá variar, e como no caso da redução, haverá a formação de um pico com o valor de potencial (E) anódico praticamente igual ao do potencial (E) catódico para um sistema reversível. A corrente de pico obtida (I) é proporcional à concentração do cobre, sendo um sinal analítico correspondente a uma concentração que estaria abaixo do limite de detecção na medida voltamétrica. A pré-concentração faz com que a concentração na gota de mercúrio, devido ao seu minúsculo volume, seja muito maior que na solução, obtendo-se assim um sinal analítico bem maior

relativamente à concentração presente na solução, explicando-se o aumento da sensibilidade do método. A etapa de deposição ocorre no eletrodo de trabalho, eletroliticamente, aplicando-se o potencial de deposição ( $E_{dep}$ ) durante um determinado tempo e com agitação constante da solução. O tempo de deposição ( $t_{dep}$ ) é escolhido em função de características da espécie eletroativa, marcadamente da concentração (Aleixo, 2003).

A agitação constante faz com que o transporte de massa por convecção mantenha a concentração da espécie eletroativa junto à superfície do eletrodo igual à do resto da solução, permitindo uma deposição maior do metal em um dado intervalo de tempo de deposição do que se o processo de transporte de massa fosse difusional. Essa agitação deve ser feita à velocidade constante e controlada com precisão. Nesta etapa, ocorrerá então a redução do metal e conseqüentemente a sua deposição sobre a superfície do eletrodo. Após completar-se a deposição do metal, a agitação cessa e durante alguns segundos deixa-se a solução em repouso, para que a concentração do metal depositado homogeneize-se, entrando em equilíbrio na superfície do eletrodo. No eletrodo de gota de mercúrio esse equilíbrio é atingido após a concentração do metal uniformizar-se pela sua difusão na própria gota (Aleixo, 2003).

Na etapa de redissolução, faz-se a varredura de potencial na direção anódica, onde o voltamograma será registrado, obtendo-se o sinal analítico de acordo com o método voltamétrico escolhido. O metal depositado se redissolve quando o seu potencial de pico for atingido (Aleixo, 2003).

Dentre as técnicas voltamétricas empregadas para a determinação da especiação de metais em águas naturais, as principais são a Voltametria de Redissolução Anódica (VRA) e a Voltametria de Redissolução Catódica (VRC).

Na VRA, o eletrodo, freqüentemente de gota pendente de mercúrio, se comporta como um cátodo durante a eletrodeposição e como um ânodo durante o processo de redissolução, no qual a espécie de interesse é oxidada à sua forma original. De uma maneira geral, consiste em aplicar um potencial de deposição mais catódico que o potencial de meia-onda dos metais a serem determinados, seguido de uma varredura de potencial no sentido anódico para oxidar o metal

reduzido de volta para a solução. A VRA pode ser empregada apenas na determinação de metais que apresentem uma solubilidade apreciável em mercúrio.

Uma das vantagens da utilização da Voltametria de Redissolução Anódica (VRA) é a possibilidade de realizar a pré-concentração da substância a ser determinada e chegar a limites de detecção de metais em varias faixas de concentração, que podem abranger desde  $\text{mmol L}^{-1}$  até  $\text{pmol L}^{-1}$ .

Na Voltametria de Redissolução Catódica (VRC) o eletrodo se comporta como um cátodo durante a etapa de redissolução e como um ânodo durante a etapa de eletrodeposição. Em estudos de especiação de metais por VRC são utilizados diversos tipos de substratos para mimetizar o comportamento de organismos vivos presentes no meio ambiente. Tais substâncias são depositadas no eletrodo de mercúrio durante a etapa de eletrodeposição e são responsáveis pela complexação de metais na superfície da gota. Na etapa de redissolução, as espécies metálicas são desorvidas da gota e determinadas voltametricamente. A estabilidade das superfícies ativas nos complexos formados pelo substrato determina a faixa de detecção da técnica. Variações na seleção de um ligante que forma complexos mais fracos ou mais estáveis ou na concentração do ligante adicionado, promovem alterações na faixa de detecção. Uma importante característica da VRC é a habilidade demonstrada para variar a faixa de detecção sob ordens de magnitude diferentes. Por exemplo o cobre, pode ser determinado por VRC, em águas naturais, usando como ligante o catecol, a tropolona e a salicilaldoxima (Campos e van den Berg, 1994).

Através de estudos realizados no Rio Guadiana (Espanha), Alonso e colaboradores (2004) determinaram as concentrações dos metais cobre, zinco, chumbo e cádmio, utilizando a VRA. O estudo da especiação mostrou que zinco e cádmio estão presentes em maiores concentrações na forma lábil, enquanto cobre e chumbo encontram-se principalmente complexados à matéria orgânica. Locatelli e Torsi (2001) determinaram simultaneamente  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  através da voltametria de redissolução anódica (VRAPD) e  $\text{As}^{3+}$  e  $\text{Se}^{4+}$  por voltametria de redissolução catódica (VRCPD).

Xue e Sigg (1994) avaliaram a especiação de zinco, num lago eutrofizado, através da competição de ligantes com EDTA, utilizando a VRA. Nestes estudos, determinaram concentrações da ordem de 18 a 25 nmol L<sup>-1</sup> de zinco total dissolvido e 1,3 a 1,8 nmol L<sup>-1</sup> de zinco iônico livre. Para avaliar a especiação dos metais cobre e zinco, nas águas do Mar Negro, Muller e colaboradores (2001) utilizaram VRA. Neste estudo, praticamente 99% do cobre e 95% do zinco, estavam organicamente complexados.

Estudos realizados por Meylan e colaboradores (2003) avaliaram as concentrações de cobre e zinco do rio Furtbach (Suíça). A fração dissolvida foi determinada por plasma acoplado indutivamente e espectrômetro de massa, enquanto a fração lábil de zinco através da troca com EDTA por VRA e o cobre lábil através da troca com catecol por VRC. Durante os eventos de chuva, o cobre dissolvido aumentou de 40 para 118 nmol L<sup>-1</sup> e o cobre livre de 10<sup>-14</sup> a 10<sup>-11</sup>, enquanto o zinco dissolvido aumentou de 45 para 147 nmol L<sup>-1</sup> e o zinco livre de 1 a 15 nmol L<sup>-1</sup>.

Para avaliar as propriedades do metal complexado, Muller (1996) coletou amostras de águas de estuários e da costa sul da Inglaterra. A especiação dos metais foi avaliada através da VRA. Xue *et al.* (1995) avaliaram a especiação dos metais cobre e zinco nas águas do lago Greifen através da troca com EDTA na VRA para o zinco e da troca com catecol na VRC para o cobre. As concentrações de zinco dissolvido eram aproximadamente o dobro das concentrações encontradas para o cobre. A razão da concentração de íons aquosos livres [Zn<sup>2+</sup>]:[Cu<sup>2+</sup>] eram de aproximadamente 10<sup>6</sup>.

Sodré e Grassi (2003) avaliaram a concentração de cobre nos Rios Iguaçu e Iraí, na Região Metropolitana de Curitiba. Neste trabalho, a especiação do cobre foi realizada por voltametria de redissolução anódica com pulso diferencial e utilização de etilenodiamina (EN) como ligante de competição.

Todos estes estudos demonstram a importância da utilização da voltametria de redissolução anódica e catódica na avaliação da especiação de diversos metais em ambientes aquáticos. Ambas as técnicas voltamétricas de redissolução podem fornecer resultados representativos e confiáveis, pois apresentam

excelentes limites de detecção e elevada sensibilidade analítica (Bruland *et al.*, 2000).

### ***Troca por Ligante de Competição – Voltametria de Redissolução Adsorptiva, CLE-AdSV***

A competição através da troca de ligantes, associada Voltametria de Redissolução Adsorptiva, CLE-AdSV, que se constitui em uma modalidade da Voltametria de Redissolução Catódica, VRC, tem sido amplamente utilizada para determinar a especiação de metais. Esta técnica envolve uma reação de troca com o ligante adicionado, chamado de ligante de competição, e o metal complexado e este ligante é detectado por acumulação adsorptiva e subsequente redução do metal, de acordo com a reação que segue.



Uma vez que o equilíbrio envolvendo todas as espécies presentes na amostra tenha sido estabelecido, a fração livre e os complexos originalmente mais fracos que  $ML_{ad}$  passam a integrar o sinal voltamétrico.

Normalmente, o ligante adicionado forma complexos estáveis que são acumulados adsorptivamente à superfície do eletrodo, tipicamente o de gota pendente de mercúrio. A adição de ligantes, como por exemplo, 8-hidroxiquinolina que complexa cobre, chumbo e cádmio, salicilaldoxima e catecol, que complexam cobre e ferro, ditiocarbamato pirrolidina de amônio, que complexa zinco, freqüentemente formam complexos bastante estáveis com uma ampla gama de metais.

A análise das características cinéticas da CLE-AdSV, quando aplicada a amostras ambientais, tem demonstrado que em muitos casos a interpretação baseada no equilíbrio é questionável. Quando o equilíbrio com o ligante adicionado não é obtido, as constantes de estabilidade resultantes superestimam

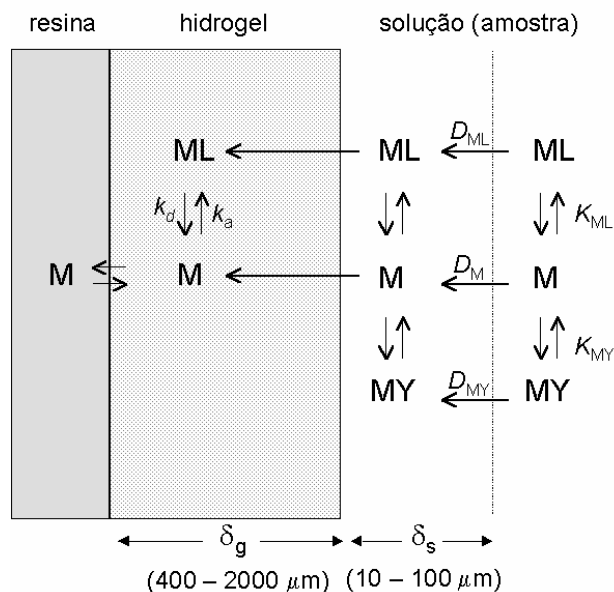
os valores reais. Esta situação é particularmente preocupante para Fe(III), Ni(II), Co(II) e Cu(II) (van Leeuwen e Town, 2005).

O tratamento dos dados é realizado através do método de Scatchard, que determina um ou dois sítios de complexação e a constante de estabilidade condicional ( $K'$ ) para os ligantes da amostra. Uma desvantagem desta técnica é sua limitação cinética, como foi dito no parágrafo anterior (van Leeuwen *et al.*, 2005).

### ***Gradientes Difusivos em Filmes Finos, DGT***

Um sensor conhecido como gradiente difusivo em filmes finos (DGT) consiste de uma camada de um hidrogel (0,4 – 2 mm de espessura) colocado sobre uma camada de esferas de resinas Chelex. A Figura 3 mostra um diagrama representativo da especiação de metais através da técnica DGT.





**Figura 3.** Diagrama esquemático representativo da técnica analítica para especiação denominada Gradiente Difusivo em Filmes Finos, *DGT*. M: metal; MY: complexo lipofílico; ML: complexo transportado através da membrana;  $k_a$ : constante de velocidade de associação do complexo;  $k_d$ : constante de velocidade de dissociação;  $K$ : constante de equilíbrio;  $\delta_g$ : espessura da camada de gel;  $\delta_s$ : espessura da camada difusional da solução;  $D$ : coeficiente de difusão.

Gradientes de concentração são estabelecidos na camada de gel à medida que as espécies a atravessam, através de difusão planar, e se acumulam na resina. Os coeficientes de labilidade e de difusão de complexos que penetram determinam a quantidade do metal que é coletada na resina. A espessura do gel ( $\delta_g$ ) influencia fortemente o fluxo do metal e portanto o tempo necessário de colocação em uso, assim como a labilidade operacional da espécie medida. Apesar desta técnica permitir a realização de medidas *in situ*, em torno de 100 segundos, o tempo de preparo da técnica é, tipicamente, de horas ou até mesmo dias (Davison e Zhang, 1994).

O metal medido acumulado dividido pelo tempo de colocação em uso fornece o fluxo  $J$ , a partir do qual a concentração de espécies dinâmicas no DGT é facilmente obtida. Quando  $\delta_g$  não é significativamente maior do que  $\delta_s$ , os

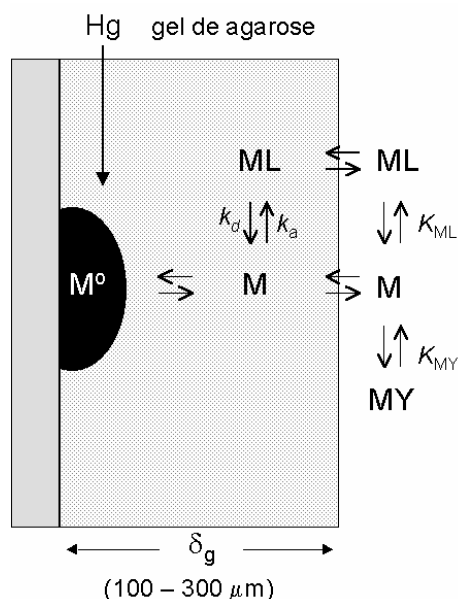
complexos lábeis podem contribuir para o metal acumulado, mesmo quando eles não penetram o gel (Fones *et al.*, 2001; Davison e Zhang, 1994).

Em estudo realizado por Twiss e Moffett (2002) o DGT foi utilizado para avaliar a concentração de cobre em locais com diferentes graus de poluição. Os resultados obtidos mostraram que as grandes variações de concentrações confirmam a precisão dos valores, demonstrando que o DGT é uma técnica promissora para avaliar a especiação de metais em ambientes aquáticos.

Em outro trabalho recente, Meylan e colaboradores (2004) realizaram medidas *in situ* de cobre e zinco utilizando gradiente de difusão em filmes finos em dois sistemas aquáticos distintos. Os resultados foram comparados com a especiação empregando competição de ligantes e também por medidas voltamétricas, utilizando VRA para o zinco e VRC para o cobre. Os resultados obtidos por diferentes técnicas apresentaram-se similares. As medidas também foram comparadas através de cálculos utilizando programas de especiação. A partir da aplicação dos modelos foi possível observar que concentrações de zinco livre e lábil previstas estavam de acordo com os dados obtidos experimentalmente. A concentração de cobre livre calculada foi superestimada porque os modelos não consideram os ligantes fortes, provavelmente complexados ao cobre, presentes nas águas naturais estudadas.

### ***Microeletrodo Integrado a Gel, GIME***

O microeletrodo integrado a gel, GIME, é um sensor composto por um único microeletrodo, ou por um arranjo de microeletrodos (Belmont-Hébert *et al.*, 1998), separados da solução de interesse por uma camada de hidrogel, geralmente agarose, com espessura típica de 0,1 a 0,3 mm. A Figura 4 mostra um diagrama que corresponde à análise através do GIME.



**Figura 4.** Diagrama representando a técnica analítica para especiação denominada Microeletrodo Integrado a Gel, *GIME*. M: metal; MY: complexo lipofílico; ML: complexo transportado através da membrana;  $k_a$ : constante de velocidade de associação do complexo;  $k_d$ : constante de velocidade de dissociação;  $K$ : constante de equilíbrio;  $\delta_g$ : espessura da camada de gel.

Na prática o GIME é deixado em equilíbrio com a amostra, então é realizada a redução do metal, seguida de sua redissolução voltamétrica dentro do gel. Como no caso do DGT, o gel serve para excluir os colóides de maior tamanho (interferentes voltamétricos) e para prover as condições de difusão molecular. Desta maneira é possível realizar uma interpretação confiável dos sinais em termos de expressões de fluxo físico-químico rigorosas.

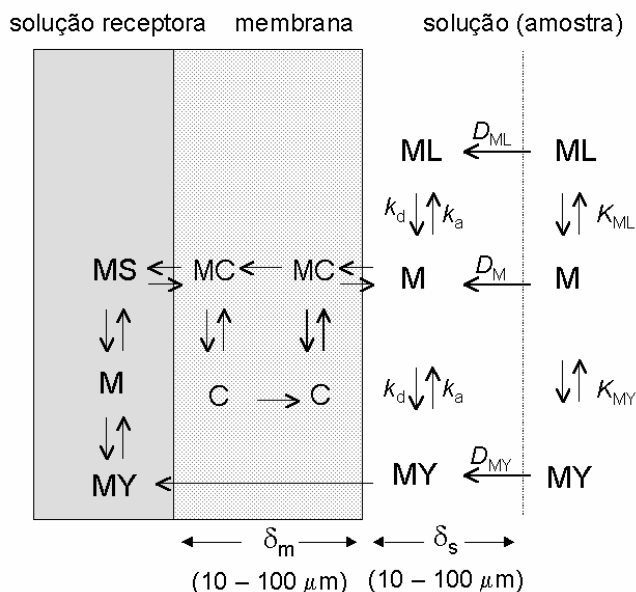
Esta técnica é de grande importância para medidas *in situ* em corpos aquáticos naturais tais como lagos e rios, com condições hidrodinâmicas não controladas. No caso da agarose tem sido demonstrado que a difusão de espécies com raio inferior a 2 - 3 nm não é afetada por efeitos estéricos, ao passo que tais efeitos não são completamente negligenciáveis para espécies com raios na faixa de 10 a 30 nm (Fatin-Rouge *et al.*, 2003). De qualquer maneira estas espécies constituem uma contribuição pequena ao fluxo redutivo do metal em microeletrodos voltamétricos.

A técnica baseada no emprego do GIME tem sido modificada visando o desenvolvimento de sensores com melhor seletividade e sensibilidade frente a diferentes espécies de interesse. Isso tem sido feito, por exemplo, pela incorporação de uma fina camada de resina que promova a complexação na interface entre o eletrodo voltamétrico e a camada de gel (CGIME), como forma de viabilizar a medida específica do íon metálico livre, ou ainda por meio da incorporação de micropartículas hidrofóbicas no gel, para minimizar a ocorrência de adsorção de compostos hidrofóbicos interferentes (Noël *et al.*, 2003).

As técnicas VR e DGT têm sido amplamente aplicadas para medidas *in situ* em águas naturais. Entretanto tem havido poucas tentativas de interpretar os resultados em termos da natureza dinâmica das espécies metálicas medidas. Os resultados envolvendo VR acoplado a GIME para amostras de água fluvial com alta concentração de colóides inorgânicos forneceram valores para espécies metálicas com tamanho menor que alguns nanômetros, que foram atribuídos principalmente a complexos de carbonatos. De modo coerente com sua escala de tempo efetivo maior, o DGT geralmente mede uma quantidade maior de espécies dinâmicas. Dispositivos DGT com tamanho de poros de gel muito pequenos têm sido identificados por excluir em grande parte os complexos metal-material húmico. Gel com poros que não são maiores do que os raios de ácidos fúlvicos e húmicos (<3nm) mostram uma permeabilidade muito reduzida (van Leeuwen *et al.*, 2005).

### ***Permeação em Membrana Líquida, PLM***

A técnica de Permeação em Membrana Líquida (PLM) baseia-se na utilização de um solvente orgânico não miscível em água, contendo um ligante denominado carregador (C), seletivo para o metal de interesse (M), que é incorporado a uma membrana hidrofóbica porosa colocada como “um recheio de um sanduíche” entre duas fases aquosas: a solução de origem (amostra) de um lado e a solução receptora de outro.



**Figura 5.** Diagrama representando a técnica analítica para especiação Permeação em Membrana Líquida, PLM.  $k_a$ : constante de velocidade de associação do complexo;  $k_d$ : constante de velocidade de dissociação;  $K$ : constante de equilíbrio;  $\delta_s$ : espessura da camada difusional da solução;  $\delta_m$ : espessura da membrana;  $D$ : coeficiente de difusão; M: metal; MY: complexo lipofílico; ML: complexos que contribuem para acumulação no sensor; MS: metal ligado a solução receptora; MC: metal ligado ao carregador; C: carregador orgânico.

A separação de espécies está baseada na partição líquido-líquido conforme a Equação 5, onde  $A^{n-}$  é o contra íon.



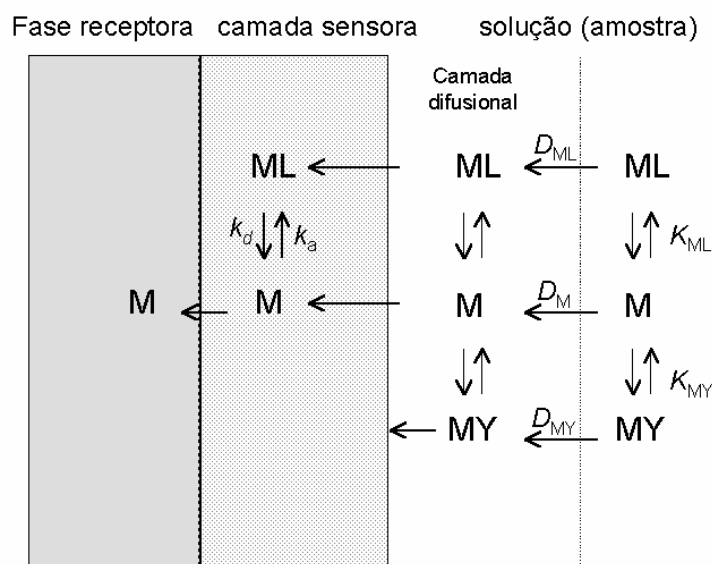
O fluxo do metal ocorre quando a força de complexação aumenta no sentido da amostra (solução teste) para a membrana hidrofóbica e para a solução receptora. Isso depende do transporte difusivo na membrana hidrofóbica, da solução aquosa de origem, das soluções receptoras. O fluxo é medido através da determinação da concentração do metal na solução receptora em função do tempo. O fluxo, e portanto a natureza da espécie medida, pode ser alterado através da manipulação das etapas controladoras da difusão: (i) se a difusão na

solução de origem é ajustada para que limite a velocidade de difusão, então tanto o metal livre quanto os complexos lábeis são determinados; (ii) se a difusão ao longo da membrana governa o fluxo, então apenas o íon metálico livre é medido. A etapa de controle da velocidade pode ser ajustada variando a espessura da membrana ( $\delta_m$ ) e a concentração do ligante carregador em um intervalo amplo de valores (Salaun *et al.*, 2004).

Além do modo de trabalho dinâmico, a técnica baseada na permeação em membrana líquida também pode ser empregada na determinação da concentração do íon metálico livre em um intervalo de tempo superior aquele no qual o estado de equilíbrio tenha sido atingido (van Leeuwen *et al.*, 2005).

### ***Técnica de Membrana de Donnan, DMT***

Nesta técnica, uma membrana porosa carregada é colocada entre a amostra (aqui chamada solução doadora) e a solução receptora (aceptora), como mostra a Figura 6.



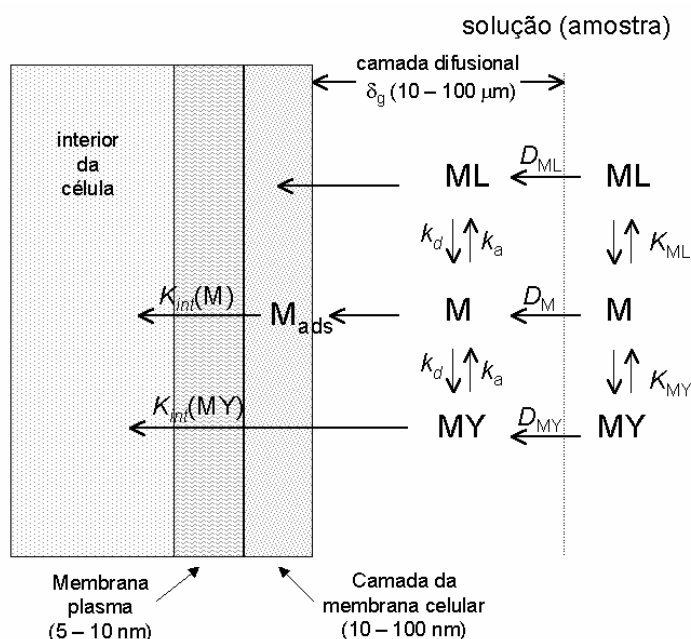
**Figura 6.** Diagrama representando a técnica analítica para especiação Técnica de Membrana de Donnan, DMT. M: metal; MY: complexo lipofílico; ML: complexos que contribuem para acumulação no sensor;  $k_a$ : constante de velocidade de associação do complexo;  $k_d$ : constante de velocidade de dissociação;  $K$ : constante de equilíbrio;  $D$ : coeficiente de difusão.

A discriminação entre as espécies é baseada principalmente em suas cargas. A medida ocorre após o equilíbrio ter sido alcançado, o que tipicamente ocorre na faixa de dias. Avanços recentes têm levado em consideração um modo mais rápido de fluxo sob condições de estado estacionário (Temminghoff *et al.*, 2000; Weng *et al.*, 2005).

### **Eletrodos Íon-Seletivos, ISE**

Os eletrodos íon-seletivos baseiam-se no equilíbrio de partição do íon de interesse entre um líquido hidrofóbico iônico e a solução da amostra. O potencial de equilíbrio, ou de estado estacionário da membrana, resultante é medido e relaciona-se à concentração do íon metálico livre. Recentemente, princípios dinâmicos têm sido aplicados às medidas, o que tem contribuído para a obtenção de melhores limites de detecção, em função do controle do fluxo de íons (Ceresa *et al.*, 2001).

Segundo van Leeuwen e colaboradores (2005) a variedade atual de técnicas analíticas é o lastro para uma abordagem quantitativa da especiação de metais e sua biodisponibilidade. Assim sendo, os critérios de bioabsorção de metais para microorganismos podem ser formulados de uma maneira análoga àquela observada para a labilidade analítica. Sendo assim, a Figura 7, a seguir, apresenta um diagrama que representa, de uma forma generalizada, os processos químicos envolvidos na difusão de metais nos microorganismos aquáticos.



**Figura 7.** Representação generalizada de processos químicos de difusão nos microorganismos.  $K_{int}$ : constante de velocidade de internalização; M: metal; MY: complexo lipofílico; ML: complexos que contribuem para acumulação no sensor;  $k_a$ : constante de velocidade de associação do complexo;  $k_d$ : constante de velocidade de dissociação;  $K$ : constante de equilíbrio;  $\delta_g$ : espessura da camada de gel;  $D$ : coeficiente de difusão.

A Figura 7 representa a absorção de um metal M na interface microorganismo/solução. Considerando-se a situação de uma superfície (microorganismo ou sensor) em contato com uma solução (amostra) contendo M e ML onde a espécie iônica livre M seja consumida, o fluxo global do metal M para a interface biológica (sensor) é resultante de dois fatores: difusão da espécie M e



cinética de interconversão entre M e suas várias espécies no sistema complexo. Complexos inertes, neste caso, uma situação única onde a dissociação de ML é muito lenta e, assim sendo, não contribui para o fluxo. Portanto, o sinal analítico deverá ser correspondente à concentração do íon metálico livre.

Levando em consideração todas as premissas mencionadas anteriormente, para sistemas operacionalmente dinâmicos onde exista um fluxo interfacial de espécies metálicas livres, os complexos metálicos serão lábeis se houver uma interconversão freqüente entre M e ML durante o seu transporte através da camada de difusão.

Não obstante estes aspectos, é importante mencionar que para situações envolvendo metalo-complexos com um dado ligante, são observadas diferenças na labilidade devido a diferentes velocidades de troca. Por exemplo, o complexo Cu(II)NTA é completamente lábil quando se emprega a técnica de gradientes difusivos em filmes finos, enquanto os complexos Ni(II)NTA não.

Uma avaliação crítica de sistemas que foram estudados através de mais de uma técnica de especiação evidencia que os resultados obtidos são coerentes com a escala de tempo relativa da difusão. Por exemplo, complexos de Cd(II) com NTA são eletroquimicamente semi-lábeis em um microeletrodo voltamétrico e são completamente lábeis quando se emprega DGT, devido a escala de tempo de difusão muito mais longa característica desta técnica. Complexos de ácidos fúlvicos ou húmicos com Cd(II) são geralmente lábeis quando se trabalha com DGT, PLM, VR e SCP, enquanto que aqueles com Cu(II) são considerados menos lábeis sob condições experimentais similares.

De acordo com van Leeuwen e colaboradores (2005), a mobilidade física de complexos metálicos também deve ser considerada na interpretação de espécies operacionalmente dinâmicas. Para os ligantes fúlvicos e húmicos heterogêneos, o coeficiente de difusão efetivo para os seus complexos é significativamente mais baixo do que aquele para o metal livre, e isso se aplica, de modo geral, para os ligantes coloidais inorgânicos de maior tamanho. Um fluxo de metal relativamente baixo pode surgir a partir de uma mobilidade reduzida independentemente da cinética de dissociação. Portanto o conceito de espécies dinâmicas envolve tanto

aspectos relacionados à mobilidade quanto à labilidade. Um exemplo do impacto da mobilidade de espécies metálicas no fluxo medido é a especiação de Zn(II), Cd(II), Pb(II), Cu(II), que foi estudada através de medidas utilizando voltametria de redissolução anódica com onda quadrada e GIME, no Rio Arve na Suíça. Este rio contém uma quantidade elevada de partículas de aluminossilicatos (argila), mas não apresenta grandes quantidades de compostos orgânicos capazes de formar complexos metálicos na fração dissolvida. Estudos envolvendo medidas experimentais e modelagem matemática demonstraram que uma pequena proporção dos metais está na forma livre ou dos chamados complexos fracos, ou seja, complexos inorgânicos envolvendo  $\text{OH}^-$ ,  $\text{CO}_3^{3-}$  e  $\text{SO}_4^{2-}$ . Estas espécies têm mobilidades similares aquelas de íons metálicos que irão penetrar na camada de gel GIME. O restante dos metais está ligado a partículas que têm tamanhos maiores que 5 - 10 nm. A contribuição destas espécies metálicas particuladas para o fluxo medido na voltametria será pequena porque (i) as partículas com diâmetros maiores do que 70 nm são excluídas do gel no GIME e (ii) a mobilidade das partículas menores capazes de penetrar o gel é inerentemente pequena. Sob condições naturais, a fração de espécies com mobilidade demasiadamente pequena para ser medida pela voltametria é bastante significativa e varia de 60 a 90% conforme o metal.

Outros estudos têm comparado medidas através de técnicas diferentes em águas naturais e em soluções de solo. A colocação em uso de uma associação de sensores fornece uma gama complementar de informações. Técnicas que permitem aquisição rápida de dados, tais como GIME com uma camada de gel relativamente fina, podem ser utilizadas para o acompanhamento de variações da especiação com alta resolução temporal. Isso pode ser uma vantagem muito grande, onde a evolução com o tempo de (i) concentrações totais de Cu(II), Pb(II) e Cd(II), (ii) as concentrações das suas espécies dinâmicas e (iii) as concentrações de íons metálicos livres foram medidas simultaneamente *in situ* por voltametria em um estuário no Reino Unido. O acompanhamento das concentrações em tempo real é de grande importância na interpretação biogeoquímica da circulação de metais.

Métodos com tempo de aquisição de dados mais longos ou intermediários (PLM, horas; DGT, dias) medem concentrações fazendo uma média sobre o tempo de acumulação. Obviamente as exigências dinâmicas sobre um sensor de especiação dependem da natureza do objetivo do trabalho. De qualquer maneira, a comparação de curvas obtidas durante períodos de tempo mais longos permite uma melhor compreensão da natureza de sinais médios obtidos com técnicas lentas (van Leeuwen *et al.*, 2005).

Sinais analíticos de sensores dinâmicos são obtidos sob condições de estado estável. A fração dinâmica operacionalmente medida incorpora desta maneira todas as espécies lábeis, em proporção a suas mobilidades. Para cada técnica o sinal analítico é tomado como sendo quantitativamente proporcional ao fluxo integrado sobre o tempo de acumulação (van Leeuwen *et al.*, 2005).

É evidente que a labilidade se altera drasticamente com escalas de tempo e escalas espaciais, portanto, diferentes tipos de técnicas para situações de não equilíbrio, para análise de especiação, terão cada uma delas a sua própria janela cinética característica e de acordo com isso serão capazes de medir uma determinada proporção operacionalmente dinâmica da espécie metálica. Assim sendo, a labilidade de espécies complexas será maior em um dispositivo DGT ( $\delta_g$  da ordem de  $10^{-3}$  m) do que em um GIME ( $\delta_s$  na faixa de  $10^{-5}$  a  $10^{-4}$  m para a etapa de deposição) (van Leeuwen *et al.*, 2005).

Com base em todos estes aspectos é possível afirmar que a variedade atual de técnicas analíticas abrangendo uma gama de janelas cinéticas, e a estrutura dinâmica genérica para interpretação de seus sinais, estabelece o lastro para uma abordagem quantitativa sofisticada para um melhor conhecimento da especiação de metais e sua biodisponibilidade (van Leeuwen *et al.*, 2005).

Embora o presente trabalho tenha empregado apenas uma das inúmeras abordagens possíveis para o estudo da especiação de metais, entendemos que a apresentação de outras estratégias, assim como a comparação entre elas, é importante na medida em que permite o acompanhamento do estado da arte no âmbito de estudos envolvendo a especiação de metais. Mais do que isso, nessa

breve revisão crítica são apresentadas e discutidas as perspectivas futuras para os estudos envolvendo a especiação e a biodisponibilidade de metais em ambientes aquáticos.

Embora cada uma das técnicas aqui descritas apresente diferentes peculiaridades, o que resulta, muitas vezes, em interpretações distintas, é possível afirmar que todos os estudos relatados demonstram claramente que a toxicidade de metais é reduzida em função da formação de precipitados e complexos formados por agentes orgânicos sintéticos e naturais. Neste sentido, as informações geradas representam uma importante contribuição, evidenciando como a especiação química de metais pode ser utilizada no estabelecimento e aprimoramento dos padrões de qualidade para estas espécies em corpos aquáticos receptores (Allen e Hansen, 1996).

### **1.3 Interações entre Metais, Matéria Orgânica Dissolvida e Microalgas**

A interação entre a MOD e a superfície carregada de células de microalgas ainda é pouco conhecida e representa um desafio para a percepção atual da fronteira entre uma célula viva e o ambiente aquático ao seu redor, que tem forte influência sobre aspectos ecotoxicológicos (Campbell *et al.*, 1997). Lombardi *et al.* (2005), Knauer *et al.* (1998) e Abu Al-Rub *et al.* (2005), entre outros estudos, descrevem que a interação do fitoplâncton com os metais-traço no ambiente aquático pode afetar a especiação química do metal, através da substituição de ligantes complexados com o metal e também na forma como o metal está presente na coluna de água e nos sedimentos.

A estrutura e a função de um ecossistema aquático são dominadas pelas interações recíprocas existentes entre os seres vivos e seu ambiente não-vivo. A importância de estudos envolvendo os produtores primários, ou seja, as microalgas, metais e a matéria orgânica, está centrada no funcionamento equilibrado dos ecossistemas. Informações precisas sobre a MOD e seu efeito na dinâmica de metais e em superfícies celulares permitem prever a extensão da contaminação ambiental causada pela presença de metais (Lombardi *et al.*, 2002).

A interação entre microalgas, a MOD e metais, que ocorre em ambientes aquáticos naturais, é grandemente responsável pelo destino e efeitos de metais-traço nesses ambientes. A importância de microalgas reside no fato de apresentarem superfície carregada e atuarem no seqüestro de íons metálicos através desta superfície, podendo, além disso, absorver e acumular espécies metálicas, transferindo-as através da cadeia trófica. A matéria orgânica dissolvida, que inclui o material excretado pelas microalgas, atua diretamente na especiação química de metais-traço, alterando assim sua biodisponibilidade. Cobre e zinco, por exemplo, são micronutrientes importantes em ambientes aquáticos, porém podem ser igualmente tóxicos quando presentes em concentrações mais elevadas que aquelas consideradas basais (Xue *et al.*, 1995).

Os excretados das microalgas são constituídos por matéria orgânica natural, majoritariamente composta por carboidratos e polissacarídeos (Lombardi *et al.*, 2005). Apesar do intensivo estudo da estrutura e propriedades físicas dos polissacarídeos microalgais, pouco se conhece sobre o funcionamento e significado destes produtos extracelulares. A produção e a excreção de agentes complexantes de metais pelas microalgas gera diversas conseqüências para os ambientes aquáticos. Dependendo da natureza do agente quelante produzido, a toxicidade do metal pode ser diferentemente afetada. Através da troca de metabólitos capazes de complexar metais, as algas podem modificar a especiação dos mesmos no ambiente aquático, afetando sua mobilidade, biodisponibilidade e toxicidade (Lombardi e Vieira, 1999; Lombardi e Vieira, 2000).

As atividades antrópicas podem inserir nos ambientes aquáticos substâncias orgânicas e inorgânicas. As substâncias inorgânicas, particularmente o fósforo, estimulam o crescimento indesejável de algas, que podem produzir toxinas perigosas. Organismos como algas, bactérias e vírus respondem de várias formas a poluição, de maneira que todos estes fatores podem resultar no declínio da qualidade da água devido à produção de toxinas, acidificação e perdas expressivas de oxigênio dissolvido (Gwynfryn, 2001).

Ecossistemas lacustres que apresentam elevados valores de temperatura são influenciados diretamente em seus processos vitais, tais como produtividade

primária e decomposição de matéria orgânica. Quando os valores de temperatura são elevados, ocorre intensa reprodução dos organismos fitoplanctônicos conseqüentemente, intensa absorção de nutrientes dissolvidos (Esteves, 1998), provocando os chamados “blooms” de algas (Jackson, 1995).

Segundo Gwynfryn, (2001) os principais fatores que controlam o funcionamento de um lago ou de um rio são: (a) escoamento, descarga e parâmetros tais como pH, concentração de oxigênio, reações redox, tamanho das partículas, interações com o solo, e complexos orgânicos e inorgânicos; (b) fatores sazonais, como temperatura e luminosidade, e (c) fatores antropogênicos e aporte de contaminantes. Desta forma, a eutrofização pode ser natural ou artificial. Quando natural, é um processo lento e contínuo que resulta do aporte de nutrientes trazidos pelas chuvas e pelas águas superficiais que erodem e lavam a superfície terrestre. A eutrofização natural corresponde ao que poderia ser chamado de “envelhecimento natural” de um lago. Quando ocorre artificialmente, ou seja, quando é induzida pelo homem, a eutrofização é denominada artificial, cultural ou antrópica. Neste caso, os nutrientes podem ter diferentes origens, como efluentes domésticos, efluentes industriais e/ou atividades agrícolas, entre outras. Este tipo de eutrofização é responsável pelo “envelhecimento precoce” de ecossistemas lacustres. A eutrofização artificial é um processo dinâmico, no qual ocorrem profundas modificações qualitativas e quantitativas nas comunidades aquáticas, nas condições físicas e químicas do meio e no nível de produção do sistema, podendo ser considerada uma forma de poluição (Esteves, 1998).

Tomando-se como base os estudos promovidos em mananciais de abastecimento público, percebe-se que os motivos principais para o aumento da incidência de cianobactérias são decorrentes do processo de eutrofização artificial, aos quais estes reservatórios têm sido submetidos, especialmente no Brasil (Grassi, 2001).

No meio aquático, a disponibilidade de elementos-traço é fortemente influenciada pela concentração de matéria orgânica dissolvida. Este fenômeno é de grande importância para a produtividade do sistema aquático, pois o fosfato também se adsorve as moléculas orgânicas, porém menos eficazmente do que os

elementos-traço. Deste modo, quando muitos complexos se formam, grande parte do fosfato permanece livre, podendo ser absorvido pelo fitoplâncton e pelas macrófitas aquáticas, aumentando muitas vezes a produtividade das águas. A incorporação de elementos-traço ao fitoplâncton ocorre principalmente por mecanismos passivos de adsorção, onde estes elementos ligam-se por troca catiônica aos radicais carboxil (-COOH) e por ligações de coordenação com radicais (-O-, N-). Uma vez adsorvidos, uma fração destes elementos-traço poderá ser absorvida por mecanismos ativos que ocorrem da superfície externa para o meio intracelular (Esteves, 1998).

A atividade biológica é o fator responsável pelas alterações na dinâmica de metais-traço em lagos. Este fenômeno é especialmente observado quando, através de sua atividade metabólica, os organismos promovem alterações físicas e químicas na água. As transformações químicas às quais os elementos-traço estão submetidos são ainda mais acentuadas em lagos ricos em nutrientes e com temperaturas elevadas.

Não obstante o número significativo de trabalhos relatando as interações e processos que governam a dinâmica, o destino e efeitos de metais-traço em ambientes aquáticos limnéticos, ainda existe uma grande lacuna na literatura associada à ausência de dados referentes a ambientes tropicais e subtropicais, especialmente em corpos aquáticos eutrofizados, como por exemplo o Reservatório do Irai, localizado na Região Metropolitana de Curitiba, no Paraná.

## 2 OBJETIVOS

Os objetivos gerais deste trabalho consistem em avaliar a dinâmica e o comportamento dos metais cobre e zinco nas águas do Reservatório do Iraí, um ambiente eutrofizado, localizado na Região Metropolitana de Curitiba (RMC). Nesse contexto, aplicando uma série de procedimentos experimentais, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

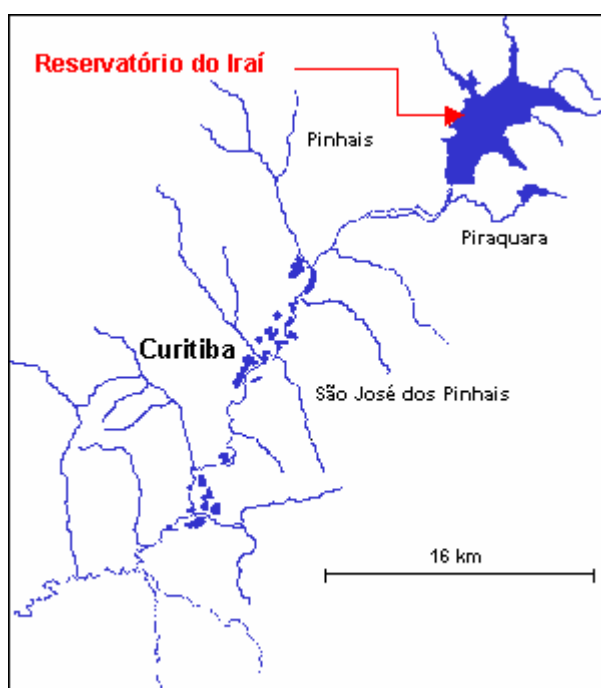
- (i) Desenvolvimento de um protocolo analítico, baseado no uso da voltametria, voltado para a determinação da especiação dos metais cobre e zinco;
- (ii) Determinação da especiação física e química dos metais cobre e zinco, nas águas do reservatório, durante um ciclo hidrológico;
- (iii) Avaliação da competição entre os metais cobre e zinco por sítios de complexação em ligantes disponíveis nas águas do reservatório;
- (iv) Caracterização das águas do Reservatório do Iraí, através de coletas sistemáticas realizadas durante um ciclo hidrológico, abrangendo parâmetros relevantes à especiação dos metais;
- (v) Avaliação da influência de efeitos sazonais no comportamento dos metais e características das águas do reservatório;
- (vi) Determinação dos níveis de clorofila-a, como forma de acompanhar possíveis florações de microalgas e de monitorar a variação sazonal da biomassa fitoplanctônica;
- (vii) Determinar a contribuição dos excretados de microalgas na especiação dos metais cobre e zinco em amostras de água coletadas do reservatório, através de culturas de microalgas desenvolvidas em laboratório, realizando com os excretados das microalgas, titulações para determinação da capacidade de complexação de cobre e zinco;
- (viii) Realizar titulações de competição por sítios disponíveis nos excretados, envolvendo os mesmos metais.



### 3 PARTE EXPERIMENTAL

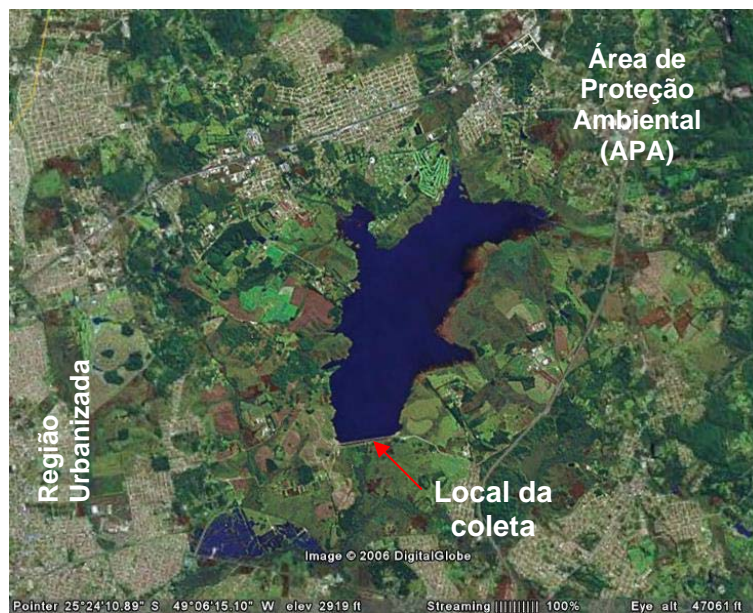
#### 3.1 Ponto de Amostragem

O local de estudo e de coletas de amostras de água para realização deste trabalho, foi o Reservatório do Iraí. Este reservatório foi inaugurado em agosto de 2000 e está localizado em Piraquara, na Região Metropolitana de Curitiba (RMC), no Paraná. Foram realizadas coletas mensais de água, durante o período de junho de 2004 a maio de 2005, totalizando doze coletas. A Figura 8 apresenta a localização geográfica do local de amostragem.



**Figura 8.** Representação esquemática da localização geográfica do Reservatório do Iraí na Região Metropolitana de Curitiba.

As coordenadas geográficas do ponto de amostragem situado no Reservatório do Iraí são; grau de latitude  $25^{\circ}25'31.7''S$  e longitude  $49^{\circ}6'26.2''W$ . A Figura 9 mostra uma imagem de satélite do local de coleta e amostragem.



**Figura 9.** Imagem de satélite do local de coleta das amostras de água no Reservatório do Iraí (Google Earth).

Desde o término de seu enchimento, no início de 2001, o Reservatório do Iraí vem sofrendo um processo contínuo de degradação ambiental, afetando inclusive a qualidade de suas águas. O reservatório vem apresentando sucessivas e massivas florações de microalgas e cianobactérias, as quais têm comprometido seriamente a qualidade da água servida à população, em função de produzirem compostos organolépticos, toxinas e excessiva matéria orgânica (Fernandes e Lagos, 2003; Fernandes *et al.*, 2003).

As coletas de amostras de água sempre foram realizadas no mesmo ponto, no final do trapiche localizado próximo a barragem. A Figura 10 a seguir, mostra fotografias tiradas no local de coleta, evidenciando dois diferentes níveis de água no reservatório.



(a)



(b)

**Figura 10.** Fotografias do Reservatório do Iraí e local de amostragem – final do trapiche; **(a)** nível mais elevado de água; **(b)** nível mais baixo de água observado.

Este reservatório é responsável, atualmente, pelo abastecimento de mais de 60% da população da RMC e foi inicialmente construído para o armazenamento de 52 milhões de metros cúbicos de água, em 14,6 km<sup>2</sup> de área inundada, com profundidade média de 5 m (Fernandes e Lagos, 2003; Fernandes *et al.*, 2003).

### 3.2 Técnicas Limpas

Devido aos baixos níveis dos metais cobre e zinco encontrados no Reservatório do Iraí, alguns procedimentos foram adotados para reduzir contaminações originadas durante as etapas de amostragem, preservação, pré-tratamento e análise. Desta forma foram empregados procedimentos fundamentados no uso de técnicas limpas (Campos *et al.*, 2002; Benoit *et al.*, 1997) em todas as etapas envolvidas na realização deste trabalho.

#### ***Limpeza de Materiais***

Os materiais empregados na determinação de cobre e zinco foram inicialmente lavados com água corrente, detergente comercial e escova. Em seguida, foram enxaguados e deixados em banho de detergente comercial 5%

durante uma semana. Após este período, os frascos foram enxaguados 5 vezes com água de torneira e 3 vezes com água destilada. Em seguida, foram imersos em banho de solução de  $\text{HNO}_3$   $1 \text{ mol L}^{-1}$  por, no mínimo, 5 dias. Finalmente, os materiais foram retirados do banho de ácido com o auxílio de luvas de polietileno limpas e enxaguados exaustivamente com água Milli-Q (Millipore). Tanto o banho de detergente quanto o de ácido foram preparados em recipientes plásticos com tampa. Todos os materiais foram inteiramente imersos nos banhos, pois a limpeza externa do material é tão importante quanto à interna. Os frascos de coleta foram preenchidos completamente com solução  $\text{HCl}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , preparada em água Milli-Q, e armazenados em sacos plásticos duplos (U.S. EPA, 1996). Durante todo o processo de limpeza, os materiais foram colocados em bandejas plásticas limpas. Todos os reagentes utilizados durante o procedimento de lavagem dos materiais foram de grau analítico ou foram purificados no laboratório. A purificação do  $\text{HCl}$  foi realizada por destilação isotérmica conforme descrito por Campos e colaboradores (2002).

### ***Amostragem***

Todas as amostras de água do reservatório foram coletadas com o auxílio de um balde de polietileno previamente ambientado com a própria água a ser coletada. As amostras foram cuidadosamente transferidas para frascos de polietileno previamente ambientados (U.S. EPA, 1996). As coletas foram realizadas por duas pessoas, segundo o princípio “mãos sujas-mãos limpas” onde uma pessoa é responsável pelo manuseio do frasco de coleta (balde), da embalagem plástica externa e de outros materiais denominados “sujos”, enquanto que outra pessoa tem contato apenas com a amostra já coletada e com os materiais denominados “limpos”, como por exemplo, os frascos para armazenamento das amostras (U.S. EPA, 1994). Os frascos contendo as amostras de água foram duplamente ensacados e armazenados em caixa de isopor preenchida com gelo. As amostras foram mantidas resfriadas durante todo o trabalho de campo para evitar a dessorção de metais do material particulado

para a solução e também para minimizar a atividade biológica (Campos *et al.*, 2002). Durante todo o período de amostragem foram utilizadas luvas de polietileno e luvas cirúrgicas sem talco, limpas.

### ***Manipulação da Amostra e de Materiais***

No manuseio da amostra e dos materiais empregados na determinação de cobre e zinco foram utilizadas luvas cirúrgicas sem talco ou luvas descartáveis de polietileno limpas. Alguns materiais, tais como membranas de filtração e barras magnéticas de agitação, foram sempre manuseados com auxílio de uma pinça plástica. No momento da preparação das alíquotas para análise, materiais como células voltamétricas, aparatos de filtração, foram colocados para escorrer sobre lenço de papel limpo. Adições da amostra ou de reagentes foram realizadas rapidamente. No intervalo entre cada medida voltamétrica o conjunto de eletrodos foi lavado com água Milli-Q,  $\text{HNO}_3$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  e, novamente, com água Milli-Q.

### **3.3 Coleta das Amostras**

Para cada coleta realizada foram utilizados dois frascos novos de coleta com capacidade para armazenar 1 L de amostra. As campanhas de amostragem duraram, em média, 2 horas. Assim que chegaram ao laboratório, as amostras foram imediatamente filtradas a vácuo em sistema fechado e previamente lavado. A filtração foi conduzida em membranas de acetato de celulose (Schleicher & Shuell), com 0,45  $\mu\text{m}$  de porosidade, para separar a fração dissolvida da particulada. Alíquotas reservadas para a determinação dos metais cobre e zinco na fração dissolvida e na amostra *in natura* foram imediatamente acidificadas com  $\text{HNO}_3$  até  $\text{pH} < 2$ . Em seguida, todas as amostras foram preservadas em refrigerador (4°C), até a realização das análises (Campos *et al.*, 2002).

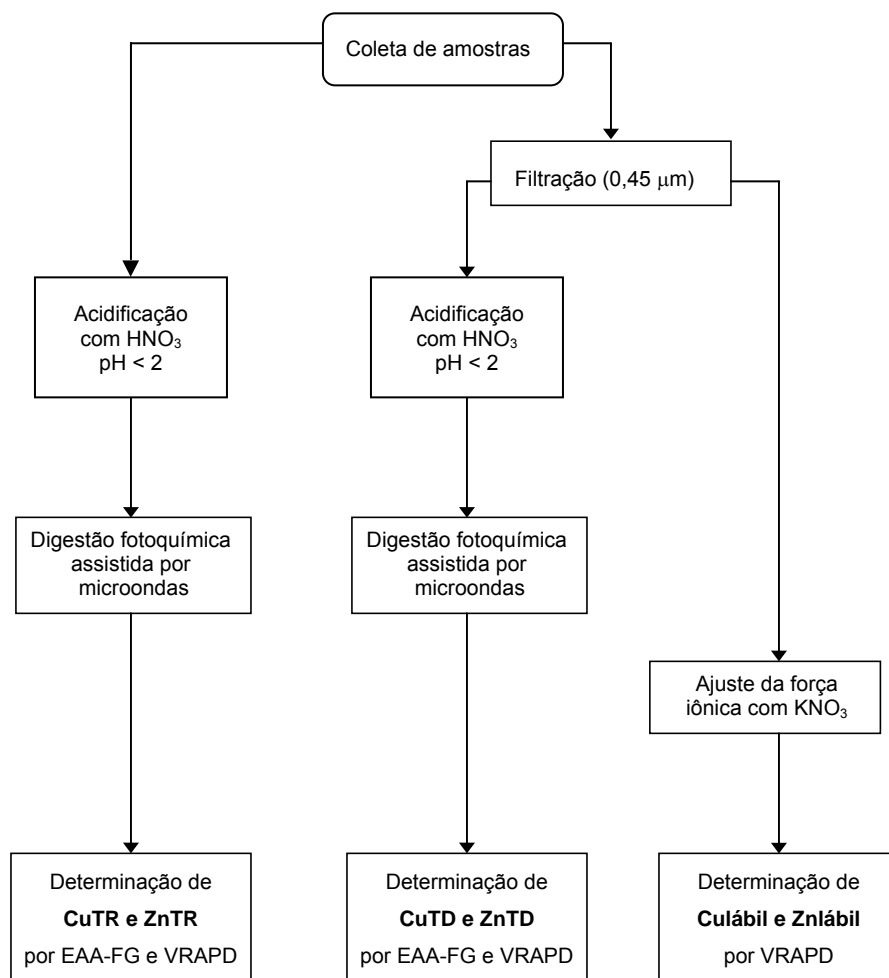
Após a coleta das amostras para especiação dos metais, coletava-se em um frasco de 5 L uma amostra para a determinação de clorofila-a. Nesta análise não havia a necessidade de realizar a coleta conforme os procedimentos baseados em técnicas limpas descritos anteriormente.

### 3.4 Digestão das Amostras

Para a determinação de cobre e zinco nas frações recuperável e dissolvida, as amostras foram inicialmente submetidas à digestão de acordo com procedimento descrito por Sodré *et al.* (2004). O procedimento de digestão baseia-se na ação da radiação ultravioleta gerada em um reator (UV LAB EL 10) ativado por microondas. Uma alíquota de 12 mL da amostra filtrada e acidificada, denominada fração dissolvida, foi transferida para o reator, sendo em seguida adicionados 20  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (38%), que foi então inserido, sem a tampa, em forno microondas (Electrolux ME 900). Durante a digestão foram empregados 3 ciclos de 2 min de irradiação, utilizando-se a potência máxima nominal do forno microondas, cerca de 900 W. Para a alíquota da fração recuperável foi realizado o mesmo procedimento descrito para fração dissolvida. Porém, era realizada uma nova adição após os 3 primeiros ciclos de digestão, de 20  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (38%). Em seguida eram realizados mais 3 ciclos digestão, de 2 min cada um deles. Um béquer contendo aproximadamente 1 L de água foi colocado no forno juntamente com o reator, para dispersar o calor gerado e evitar perdas por ebulição da amostra. Entre cada ciclo de irradiação a água contida no béquer era substituída e o reator permanecia em banho de gelo por aproximadamente 15 minutos.

### 3.5 Especificação de Cobre e Zinco

A especificação dos metais cobre e zinco consistiu na determinação das concentrações do metal na amostra *in natura* (metal total recuperável) e na fração dissolvida (metal total dissolvido), além da determinação da fração lábil através de titulações da amostra, separadamente para cada metal, com adições de padrões do respectivo metal, utilizando voltametria de redissolução anódica (VRA). O procedimento experimental adotado para a especificação de cobre e zinco encontra-se esquematizado na Figura 11.



**Figura 11.** Fluxograma do procedimento analítico adotado para a determinação da especiação dos metais cobre e zinco nas águas naturais do Reservatório do Iraí.

Para a determinação dos teores de cobre e zinco total dissolvido, denominado CuTD e ZnTD, e cobre e zinco total recuperável CuTR e ZnTR, alíquotas previamente acidificadas das frações dissolvida e *in natura*, foram digeridas utilizando o procedimento descrito anteriormente. Após digestão, as determinações de CuTD, ZnTD e de CuTR e ZnTR, foram realizadas por voltametria de redissolução anódica (VRA), pelo método de adição de padrão em um potenciostato EG&G PAR M394 acoplado a um sistema de eletrodos de mercúrio EG&G PAR 303A, utilizando o modo gota pendente de mercúrio. As medidas empregando VRA foram realizadas até a instalação do espectrômetro de

absorção atômica. Após julho de 2004, as frações total recuperável e dissolvida passaram a ser determinadas por Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização em Forno de Grafite (AA-6800 Shimadzu).

### 3.6 Determinação da Capacidade de Complexação dos Metais Cobre e Zinco nas Águas do Reservatório do Iraí

As concentrações lábeis de cobre e zinco foram determinadas, separadamente para cada metal, por meio de titulações de amostras filtradas em membrana 0,45  $\mu\text{m}$ , em pH natural, empregando-se o mesmo sistema polarográfico descrito anteriormente.

Para a titulação, utilizou-se 10 mL da amostra de água filtrada, onde foram inicialmente adicionados, aproximadamente 0,100 g de  $\text{KNO}_3$ , como eletrólito de suporte e para ajuste da força iônica. Os parâmetros utilizados no polarógrafo para a titulação da capacidade de complexação dos metais cobre e zinco, estão descritos na Tabela 1 abaixo.

**Tabela 1.** Parâmetros utilizados para a titulação da capacidade de complexação dos metais cobre e zinco.

Parâmetros	Unidade	Cobre	Zinco
$E_{\text{dep}}$	V	-1,2	-1,2
$E_i$		-0,6	-1,2
$E_f$		0,15	-0,6
$t_{\text{dep}}$	s	600	600
$t_{\text{equilíbrio}}$		1200	1200
Purga entre as adições		180	180
Força iônica (I)	$\text{nmol L}^{-1}$	0,1	0,1
Amplitude do pulso	mV	50	50
Velocidade de varredura	$\text{mV s}^{-1}$	8	8



As titulações foram realizadas utilizando padrões de cobre e zinco contendo  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  e as adições variavam desde  $20\mu\text{L}$  até  $200\mu\text{L}$ , para ambos os metais. Quando realizada a adição de padrão na amostra, esta permaneceu em equilíbrio durante 20 minutos com a finalidade de complexar o metal adicionado aos sítios disponíveis na amostra.

As características de complexação dos metais cobre e zinco, particularmente as concentrações dos metais complexados ( $[\text{ML}]$ ) aos sítios disponíveis na amostra, e a concentração desses metais na forma lábil ( $[\text{M}']$ ), foram determinadas por VRAPD. A partir destes valores, a constante de estabilidade condicional ( $K'_{\text{ML}}$ ) e a concentração de sítios de ligação disponíveis ( $[\text{L}]_{\text{TOTAL}}$ ) foram obtidas através da aplicação do Método de Linearização de Ruzic (Ruzic, 1982; Mylon *et al.*, 2003). A obtenção destes parâmetros permitiu o cálculo da concentração do íon metálico livre  $[\text{M}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_n]$  para cada um dos metais. A concentração de sítios ligantes disponíveis e a constante de estabilidade condicional são obtidos através da aplicação da equação de Linearização de Ruzic (Mylon *et al.*, 2003), mostrada na Equação 6:

$$\frac{[\text{M}']}{[\text{ML}]} = \frac{1}{K'_{\text{ML}} [\text{L}]_{\text{TOTAL}}} + \frac{1}{[\text{L}]_{\text{TOTAL}}} \cdot [\text{M}'] \quad (6)$$

Na Equação 6 as concentrações denominadas lábeis ( $[\text{M}']$ ) são determinadas obtendo-se os dados de intensidade de corrente e da concentração total do metal na amostra (metal total dissolvido somado ao metal total adicionado), onde se constrói um gráfico com valores de corrente de pico vs. concentração total do metal (aquela presente na amostra filtrada, somada ao metal adicionado durante), para cada ponto da titulação. A partir da porção mais linear obtida neste gráfico é então obtida a equação da reta, cuja inclinação (coeficiente angular) será utilizada para o cálculo da concentração do metal lábil ( $[\text{M}']$ ) para cada ponto da curva de titulação. O cálculo desta concentração se dá

através da divisão da corrente correspondente a cada ponto pelo coeficiente angular (s), como mostrado na Equação 7.

$$[M'] = \frac{i_p}{s} \quad (7)$$

A concentração do metal complexado ([ML]), via de regra pela matéria orgânica dissolvida é obtida pela diferença entre as concentrações do metal total dissolvido e do metal lábil, como mostra a Equação 8.

$$[ML] = M_{\text{TOTAL}} - [M'] \quad (8)$$

Após a obtenção dos valores destas concentrações, um novo gráfico é construído, com base na seguinte expressão:

$$[M'] / [ML] \text{ vs. } [M'] \quad (9)$$

A partir dos coeficientes angular e linear da equação da reta obtidos através da Equação 6, determina-se os valores de  $[L]_{\text{TOTAL}}$  e  $K'$  onde, coeficiente angular =  $1/[L]_{\text{TOTAL}}$  e coeficiente linear =  $1/K' \cdot [L]_{\text{TOTAL}}$ .

Finalmente, os resultados gerados nesta etapa foram utilizados no programa de especiação química MineqL+, fundamentado em equações de equilíbrio químico, de onde foram extraídas as concentrações dos íons metálicos aquosos livres.

O equilíbrio químico serve de base para diversas aplicações, dentre elas podemos citar o controle dos mecanismos que dominam o comportamento de espécies em águas superficiais, o controle do pH, alcalinidade ou efeitos tóxicos de metais dissolvidos em ambientes aquáticos. Os íons dissolvidos em solução interagem entre si, formando complexos ou interagindo com a superfície de partículas. Em um sistema aquático natural existem diversos componentes

químicos dissolvidos em solução. Estes componentes têm potencial para formar centenas de complexos químicos dissolvidos, sólidos ou espécies adsorvidas. Algumas destas espécies químicas podem ser biologicamente ativas ou até mesmo tóxicas enquanto outros podem ser inertes. Tudo isto depende de fatores como a concentração total de cada componente, o pH, força iônica e temperatura (MineqL+, 2005).

O sistema de equilíbrio químico considera todas as reações dependentes do tempo, mas possui restrições cinéticas. Este modelo proporciona um equilíbrio termodinâmico do sistema, onde são considerados o pH, força iônica, a distribuição de espécies químicas dissolvidas, dentre outras. Os componentes selecionados a partir da base de dados do programa interagem um com o outro, fornecendo as constantes termodinâmicas para definir as reações em qualquer ambiente aquático (MineqL+, 2005).

### **3.7 Titulação de Competição entre os Metais Cobre e Zinco nas Águas do Reservatório do Iraí**

Para a realização de titulação de competição entre os metais cobre e zinco por sítios já complexados por um dos metais nas amostras de água do Reservatório do Iraí, foi necessário inicialmente conhecer os valores de concentração de sítios disponíveis para cobre e para zinco. Conhecido os valores das concentrações de sítios disponíveis, estes foram utilizados para determinar as concentrações dos metais para a fortificação da amostra antes da realização da titulação. A fortificação da amostra com um dos metais, como por exemplo o zinco, foi realizada no dia anterior a titulação com cobre. Após realizada a adição, a amostra permaneceu em equilíbrio por aproximadamente 15 horas. No dia seguinte à adição, titulou-se 10 mL da amostra contendo aproximadamente 0,100 g de  $\text{KNO}_3$  como eletrólito de suporte, com cobre, para avaliar a competição deste metal pelos sítios já ocupados pelo zinco. O mesmo procedimento foi realizado quando conhecido o valor da concentração de sítios disponíveis para zinco e então realizada a adição do zinco e posterior titulação com cobre. Os valores da

capacidade de complexação destas titulações foram obtidos através da Linearização de Ruzic e os valores de metal livre através do programa MineqL+.

### **3.8 Determinação da Capacidade de Complexação de Cobre e Zinco nos Excretados das Microalgas**

Para determinar a capacidade de complexação dos metais cobre e zinco nos excretados das microalgas, titulou-se 10 mL da cultura filtrada em membrana 0,45  $\mu\text{m}$  em pH natural (6,0) empregando-se o mesmo sistema polarográfico descrito anteriormente.

Para a titulação, além de 10 mL da amostra, utilizou-se aproximadamente 0,100 g de  $\text{KNO}_3$ , como eletrólito de suporte e ajuste da força iônica. Os parâmetros utilizados no polarógrafo para a titulação da capacidade de complexação dos metais cobre e zinco nos excretados são os mesmos citados anteriormente. As titulações foram realizadas utilizando padrões de cobre e zinco contendo 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  e as adições variavam desde 20  $\mu\text{L}$  até 200  $\mu\text{L}$ , para ambos os metais. Quando realizada a adição de padrão na amostra, esta permaneceu em equilíbrio durante 20 minutos com a finalidade de complexar o metal adicionado aos sítios disponíveis na amostra. As características de complexação dos metais cobre e zinco, foram obtidas através da aplicação do Método de Linearização de Ruzic. A obtenção destes parâmetros permitiu o cálculo da concentração do íon metálico livre para cada um dos metais, através do programa MineqL+.

### **3.9 Titulação de Competição entre os Metais Cobre e Zinco nos Excretados das Microalgas**

A titulação de competição entre os metais cobre e zinco por sítios de ligação disponíveis nos excretados das microalgas, foi realizada da mesma maneira e utilizando os mesmos parâmetros que aqueles utilizados na titulação de competição entre os metais cobre e zinco por sítios disponíveis de complexação nas águas do Reservatório do Iraí.

A partir dos valores de sítios de complexação ( $[L]_{TOTAL}$ ), obtidos separadamente nas titulações de cobre e zinco nos excretados de microalgas, obteve-se os valores correspondentes à concentração dos metais, os quais foram adicionados antes da titulação, para fortificação das amostras. A partir destes valores, realizou-se as titulações envolvendo a competição entre os metais pelos sítios de complexação já ocupados pela adição de um dos dois metais (cobre ou zinco), no dia anterior à titulação. Após a fortificação das amostras com cobre e zinco, separadamente, as mesmas foram deixadas em repouso por aproximadamente 15 h. No dia seguinte à adição, realizou-se a titulação com o outro metal. Os parâmetros de complexação, foram obtidos a partir da Linearização de Ruzic e o cálculo do metal livre através do programa MineqL+.

### **3.10 Determinação da Concentração de Clorofila-a**

Para obter a concentração de clorofila-a as amostras de água foram filtradas a vácuo, utilizando membrana de fibra de vidro (GFC-52 Schleicher & Shuell) de 0,45  $\mu m$  de porosidade, em sistema de filtração apropriado, agitando sempre a amostra antes de entornar o frasco. Deixava-se o filtro secar por aproximadamente um minuto, ainda com o sistema sob vácuo. Concluída esta etapa, dobrava-se o filtro pela metade e com o auxílio de uma pinça o filtro era colocado em um tubo de centrífuga com tampa, com capacidade para 15 mL. Quando necessário, depois de filtrada, a amostra era preservada em refrigerador a  $-18^{\circ}C$ , envolvida em papel alumínio, por no máximo 30 dias. Adicionava-se 10 mL de acetona 90 % (V/V) ao tubo de centrífuga contendo o filtro e agitava-se vigorosamente. Após agitação manual, o tubo de centrífuga era colocado imediatamente no refrigerador, na ausência de luz, para a completa extração dos pigmentos. As amostras permaneciam sob refrigeração, a  $4^{\circ}C$ , por aproximadamente 20 horas (Holm *et al.*, 1978; Parsons *et al.*, 1984).

Os tubos eram então submetidos à centrifugação (3000 rpm) por aproximadamente 45 minutos. Após esta etapa, uma alíquota do sobrenadante era retirada e submetida à análise por espectroscopia de absorção molecular na

região do visível. Durante esta etapa eram registrados os espectros da amostra e do controle, com ênfase para os sinais obtidos nos seguintes comprimentos de onda: 630, 645, 663 e 750 nm.

Em seguida, a concentração de clorofila-a era determinada de acordo com a seguinte equação (Holm *et al.*, 1978; Parsons *et al.*, 1984):

$$\text{Clorofila-a} = \frac{(11,64 \times A_{663} - 2,16 A_{645} + 0,10 A_{630}) \times v}{V \times 1} \quad (10)$$

Onde;

Clorofila-a = mg m<sup>-3</sup> ou µg L<sup>-1</sup>;

v = volume de acetona usado na extração (mL);

V = volume de amostra filtrada (L);

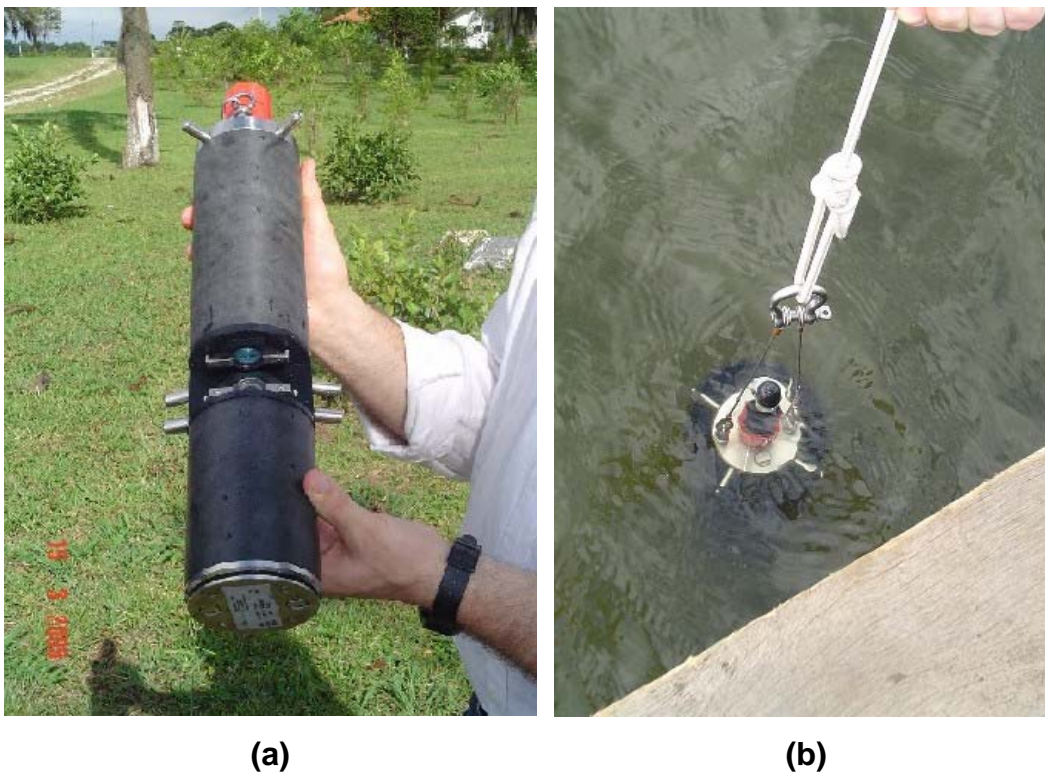
l = caminho óptico (1 cm);

A<sub>663</sub> = absorbância em 630 nm;

A<sub>645</sub> = absorbância em 645 nm;

A<sub>630</sub> = absorbância em 663 nm após correção para turbidez e controle do filtro, em todos os casos.

Foram também realizadas determinações de clorofila-a através do uso do FluoroProbe. Este equipamento é uma ferramenta utilizada em medidas de fitoplânctons, sendo capaz de medir e classificar diferentes espécies, como também de avaliar os teores de clorofila-a através de medidas por fluorescência (Fluoroprobe: bbe-moldaenke, 2005). Através da utilização do FluoroProbe realizou-se a análise e classificação das microalgas e medidas de clorofila-a, no Reservatório do Iraí, diretamente *in situ*, conforme mostra a Figura 12.



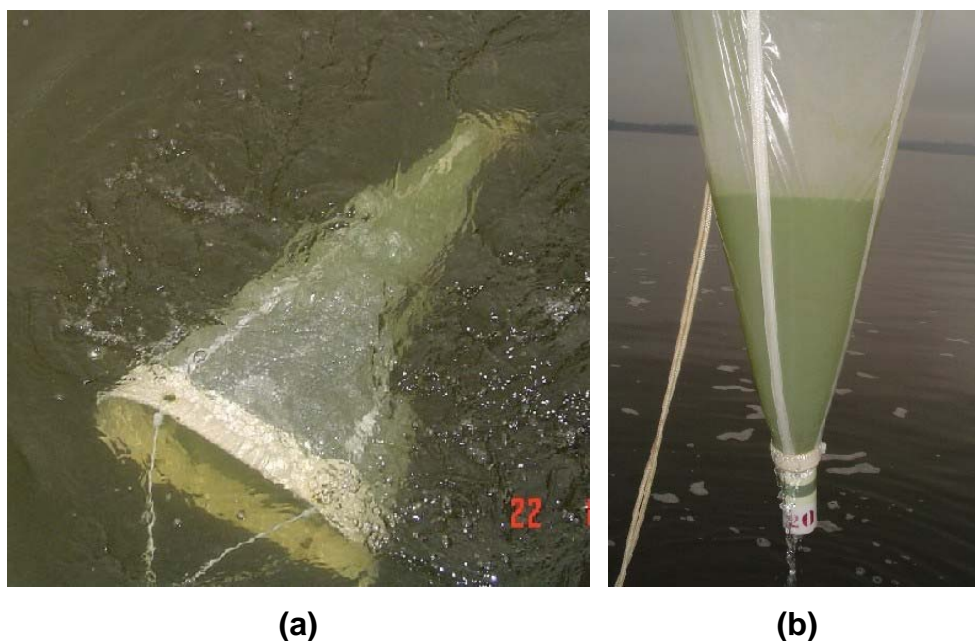
**Figura 12.** Fotografias do FluoroProbe, equipamento empregado na determinação da concentração de clorofila-a e classificação de diferentes espécies de fitoplânctons *in situ*; **(a)** visão geral do equipamento; **(b)** medida *in situ* realizada nas águas do Reservatório do Iraí.

A resposta fluorescente das algas frente à excitação através da luz visível depende principalmente da clorofila-a, que é um pigmento característico encontrado em todos os organismos fotossintetizantes. As ocorrências de outros pigmentos são típicas de diferentes classes de algas. A interação destes sistemas de diferentes pigmentos com clorofila-a resulta em um espectro de excitação de fluorescência para um grupo específico de classe taxonômica de algas. As fontes luminosas são diodos emissores de luz (LED) com comprimentos de onda selecionados (Fluoroprobe: bbe-moldaenke, 2005).

### 3.11 Cultura de Microalgas

#### *Coleta das Microalgas*

As microalgas foram coletadas em agosto de 2004, no Reservatório do Iraí, no mesmo ponto de coleta das amostras mensais. A coleta foi realizada na parte superficial do reservatório, com o auxílio de uma rede de fitoplâncton (20  $\mu$ m), que permaneceu em fluxo de água por um período de 20 minutos, conforme mostrado na Figura 13.



**Figura 13.** Fotografias **(a)** da passagem da rede de fitoplâncton nas águas do reservatório; **(b)** da rede contendo microlagas coletadas no Reservatório do Iraí em agosto/2004.

A Figura 13a mostra uma das várias passagens feitas com a rede de coleta de fitoplânctons. A Figura 13b corresponde à finalização da coleta, com as microalgas coletadas e retidas na rede.

#### *Isolamento e Manutenção das Microalgas*

O isolamento das microalgas e desenvolvimento de sua cultura foram realizados no Centro de Estudos do Mar (CEM) – UFPR, sob a responsabilidade da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Teresa Lombardi. Para a realização do cultivo foi utilizada uma



espécie de microalga isolada a partir da coleta realizada no Reservatório do Iraí. As amostras recolhidas foram mantidas em frascos de polietileno com capacidade de 500 mL e transportadas ao laboratório em caixas de isopor.

No laboratório foram preparadas placas de Petri com meio nutritivo WC (Guillard e Lorenzen, 1972) sólido, sem EDTA, ao qual foi acrescido Ágar em concentração de  $10 \text{ g L}^{-1}$ . O meio foi autoclavado por um período de 30 minutos a 1 atm, vertido nas placas e deixado resfriar por 24 horas. Nesse meio sólido as amostras com as várias espécies de microalgas resultantes da coleta foram inoculadas para isolamento. Toda a manipulação laboratorial foi realizada em capela de fluxo laminar (VLFS-12, VECO) para restringir qualquer contaminação microbiana.

As placas de Petri inoculadas com microalgas foram mantidas em condições controladas de fotoperíodo (12/12 horas claro/escuro), luminosidade ( $180 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Após cerca de 30 dias de incubação, a microalga isolada na placa de Petri foi transferida para tubos de ensaio contendo meio WC líquido autoclavado, sem EDTA. A partir daí, culturas da Chlorophyceae *Chlorella* sp. foram mantidas em erlenmeyeres de policarbonato. Para garantir aeração suficiente, as culturas eram cuidadosamente agitadas uma vez ao dia. As algas foram mantidas no meio de cultura (Guillard e Lorenzen, 1972) com pH ajustado em 6,2. A composição do meio de cultura é apresentada na Tabela 2.

**Tabela 2.** Composição do meio de cultura WC, sem EDTA, usado nos bioensaios (Guillard e Lorenzen, 1972).

<b>Composto</b>	<b>Concentração (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração (10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>)</b>
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	36,76	250
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	36,97	150
NaHCO <sub>3</sub>	12,6	150
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,71	50
NaNO <sub>3</sub>	85,01	1000
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	28,42	100
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	3,15	11,7
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,01	0,04
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,022	0,08
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,01	0,05
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,18	0,9
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,006	0,03
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,0	16
<b>Vitaminas</b>		
Tiamina	0,1	
Biotina	5×10 <sup>-4</sup>	
B <sub>12</sub>	5×10 <sup>-4</sup>	

### **Curva de Crescimento**

Uma curva de crescimento padrão de *Chlorella* sp. em cultura foi obtida inoculando-se 10<sup>5</sup> células mL<sup>-1</sup> em um erlenmeyer de policarbonato. Essa e todas as outras culturas foram tampadas com tampão de algodão para permitir trocas gasosas. A cada 3 dias, uma alíquota da cultura era retirada para contagem de células ao microscópio e acompanhamento do crescimento populacional.

### **Contagem de Células**

Amostras das culturas (2 mL) foram coletadas em ambiente estéril (capela de fluxo laminar) e armazenadas em frascos de vidro com capacidade de 10 mL e vedados com tampa de borracha. Estas amostras foram fixadas com uma gota de lugol (iodeto de potássio, iodo, água destilada, na proporção 1:2:20) e contadas posteriormente com o uso de um Hemocitômetro Fuchs-Rosenthal (área total 0,0625 mm<sup>2</sup>) sob microscópio óptico.

### **3.12 Análises Complementares**

#### ***Oxigênio Dissolvido, Temperatura da Água, Turbidez e Condutividade***

Os parâmetros temperatura da água, oxigênio dissolvido (OD), turbidez e condutividade foram medidos *in situ*, utilizando um Analisador Water Quality Checker WQC-20A TOA Electronics LTd.

#### ***pH***

Além da determinação *in situ*, o pH foi medido em uma alíquota *in natura* da amostra logo após a coleta, no laboratório, para controle. Antes das medidas o sistema de eletrodos foi calibrado com tampões pH 7,00 e 4,00.

#### ***Cloreto***

A determinação do teor de cloretos foi realizada através do método indireto de precipitação de Möhr. Neste método, a amostra filtrada e não acidificada é titulada com AgNO<sub>3</sub>. O volume e a concentração do titulante gasto é utilizado para determinar o valor de cloreto em mg L<sup>-1</sup> (APHA, 1995).

#### ***Alcalinidade Total***

A alcalinidade total foi determinada nas amostras *in natura* através da titulação potenciométrica, utilizando HCl purificado como titulante. A análise tem início com a amostra em seu pH natural e termina quando este atinge exatamente

4,5. O volume de titulante gasto é utilizado para definir os valores de alcalinidade em termos de  $\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$  (APHA, 1995).

### ***Sólidos Suspensos Totais (SST)***

Uma alíquota de volume conhecido da amostra *in natura* foi filtrada em membrana de fibra de vidro (GFC-52 Schleicher & Shuell) de  $0,45 \mu\text{m}$  de porosidade. A membrana contendo o material particulado em suspensão foi levada à estufa ( $105^\circ\text{C}$ ) até peso constante. A diferença entre o peso da membrana antes e após o processo de filtração fornece valores para sólidos totais em suspensão (SST) em  $\text{mg L}^{-1}$  (APHA, 1995).

### ***Carbono Orgânico Dissolvido (COD)***

Para a determinação de carbono orgânico dissolvido (COD), alíquotas das amostras são transferidas para frascos âmbar, acidificadas com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $\text{pH} < 2$ ) e preservadas em refrigerador ( $4^\circ\text{C}$ ). Estas amostras são mantidas sob refrigeração e as análises são realizadas em um Analisador de Carbono Orgânico Total Shimadzu, modelo TOC-VCPH.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Avaliação das Características das Águas do Reservatório do Iraí**

Para a realização deste estudo, foram coletadas mensalmente, entre junho de 2004 e maio de 2005, doze amostras no Reservatório do Iraí. Além destas coletas que completam um ciclo hidrológico, realizou-se uma 13<sup>a</sup> coleta, em setembro de 2005, com o objetivo de realizar experimentos para avaliar a competição entre os metais cobre e zinco por sítios de complexação.

A caracterização do corpo aquático em estudo foi realizada com base nas determinações de pH, nível do reservatório, níveis de oxigênio dissolvido, temperatura ambiente e da água, alcalinidade total, COD, SST, cloreto dissolvido e clorofila-a, a fim de fornecer informações relevantes à qualidade das águas, além de representar parâmetros que também influenciam a especiação dos metais. A Tabela 3 mostra, de forma resumida, os resultados obtidos para os parâmetros citados, durante todo o período de amostragem no reservatório.

**Tabela 3.** Valores mínimos e máximos, médios e medianos para os parâmetros aquáticos determinados no Reservatório do Iraí, durante o período mensal de amostragem (junho de 2004 a maio de 2005).

Parâmetros	Unidade	Valores		
		Min. – Máx.	Média	Mediana
pH		6,9 – 7,5	7,3	7,4
Nível de água do reservatório	m	2,8 – 3,4	3,1	3,0
T ambiente	°C	10 – 28	21	22,5
T água		14,7 – 26,7	21,5	21,4
OD	mg L <sup>-1</sup>	5,3 – 11,7	7,5	7,3
Cloreto		4,8 – 8,1	5,7	5,4
SST		2,6 – 13,6	8,3	8,1
COD	mg C L <sup>-1</sup>	4,1 – 15,7	7,2	5,2
Alcalinidade	mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup>	12,7 – 18,4	15,1	15,3
Clorofila-a	µg L <sup>-1</sup>	5,7 – 33,6	19,3	18,4

De acordo com os dados contidos na Tabela 3, observa-se que o pH não apresentou variações significativas, com valores determinados situando-se na faixa entre 6,9 e 7,5, característicos de ambientes lacustres.

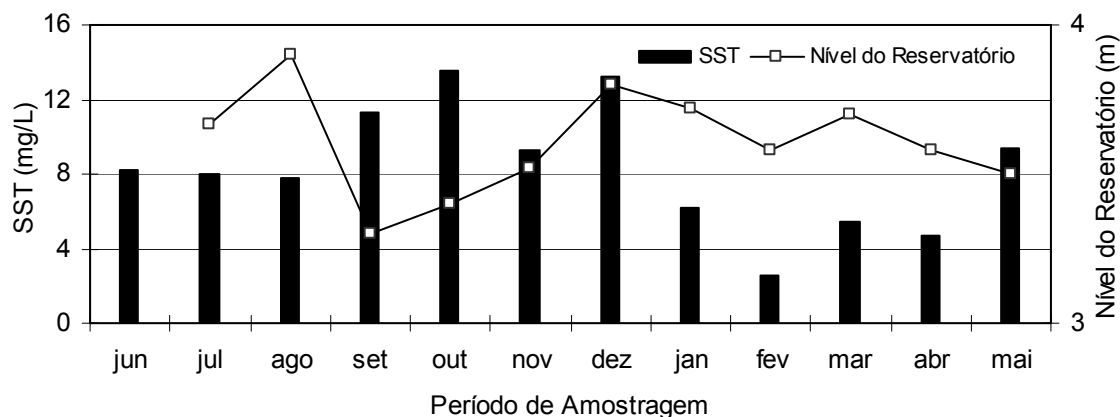
Os valores de alcalinidade nestas águas foram baixos, em média 15,1 mg de CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>. A alcalinidade de um corpo aquático pode ser atribuída a inúmeras fontes. Nas águas naturais situadas em regiões arenosas, são encontrados valores mais baixos de alcalinidade, enquanto que em locais de rochas calcárias os valores de alcalinidade são mais elevados (Abril e Frankignoulle, 2001). Outro fator importante refere-se à influência das atividades antrópicas nos níveis de alcalinidade de um corpo aquático. Alguns autores ressaltam que esta influência se dá principalmente em função do descarte de águas residuais tratadas ou não tratadas em corpos aquáticos naturais (Tchobanoglous e Burton, 1991; Verbanck *et al.*, 1994). Os níveis de alcalinidade determinados nas águas do reservatório durante o período de amostragem podem ser considerados característicos de um

corpo de água com baixa capacidade tamponante e sem excessiva influência de fatores antropópicos.

Segundo Guyton (1992), a presença de quantidades elevadas de cloreto em águas naturais pode indicar o aporte de esgotos que são descartados diretamente nos corpos de água. No ambiente de estudo, os níveis de cloreto são baixos, apresentando uma média de  $5,7 \text{ mg L}^{-1}$ , com um valor máximo de  $8,1 \text{ mg L}^{-1}$ . Pode-se considerar o local com pequeno grau de impactação, pois não há evidências de aporte expressivo de esgoto nestas águas, exceto através do número relativamente pequeno de residências localizadas próximas ao reservatório ou ainda através de seus tributários.

A determinação de oxigênio dissolvido em corpos aquáticos é uma das análises mais importantes na determinação de índices de qualidade de águas, tendo em vista que este parâmetro está diretamente relacionado à manutenção da biota aquática (Stumm e Morgan, 1996). Em um corpo de água não poluído a concentração de oxigênio dissolvido, pode variar na faixa de 8 a  $11 \text{ mg L}^{-1}$  a  $25^\circ \text{C}$ . Uma variedade de organismos aquáticos passa a apresentar problemas respiratórios se o teor de oxigênio dissolvido cair para valores abaixo de  $5 \text{ mg L}^{-1}$ , sendo que as espécies mais resistentes podem suportar até  $2 \text{ mg L}^{-1}$ . Este parâmetro foi avaliado durante todo o período de amostragem, apresentando valores mínimos de 5,3 e máximos de  $11,7 \text{ mg L}^{-1}$ , estando em conformidade com valores de ambientes aquáticos não poluídos.

Os valores de SST não apresentaram uma variação significativa, sendo que o valor médio obtido,  $8,3 \text{ mg L}^{-1}$ , não é considerado um valor representativo de um elevado aporte de material particulado. As concentrações dos sólidos em suspensão variaram entre 2,58 e  $13,60 \text{ mg L}^{-1}$ , sendo observados valores mais elevados para as amostras coletadas entre setembro e dezembro de 2004, como pode ser visto na Figura 14.



**Figura 14.** Teores de sólidos suspensos totais nas águas do reservatório e nível das águas durante os meses de junho de 2004 a maio de 2005.

Como mostra a Figura 14, o nível de água do reservatório e os teores de SST apresentam uma relação inversa. Quando o nível do reservatório apresentou valores abaixo da média, maiores foram os valores de SST determinados, exceto para o mês de dezembro de 2004, que apresentou um dos maiores níveis de água e o maior valor de sólidos em suspensão durante todo o período de amostragem. Este fator pode estar associado ao florescimento de microalgas observado neste período. Portanto, observa-se um comportamento sazonal para os sólidos em suspensão. De maneira semelhante ao que geralmente acontece para ambientes aquáticos de água corrente, os níveis mais elevados de SST foram obtidos nos meses de maior pluviosidade, o que significa que o aporte de material sólido nas águas do reservatório ocorre, provavelmente, como consequência do escoamento superficial (Sodré *et al.*, 2005 e Grassi, 2001).

Em águas naturais a matéria orgânica dissolvida é originada a partir das inter-relações entre a produção primária (fotossíntese), o metabolismo de organismos e também a partir de fontes externas, principalmente, contribuições antropogênicas (Stumm e Morgan, 1996). Neste trabalho, os valores de COD avaliados apresentaram variações significativas, de 4,1 a 15,7 mg de C L<sup>-1</sup>.

Segundo Esteves (1998), estudos realizados em lagos alemães indicaram que a concentração de COD está diretamente relacionada ao estado trófico do lago e ao tipo de influência à qual o mesmo está submetido, através de

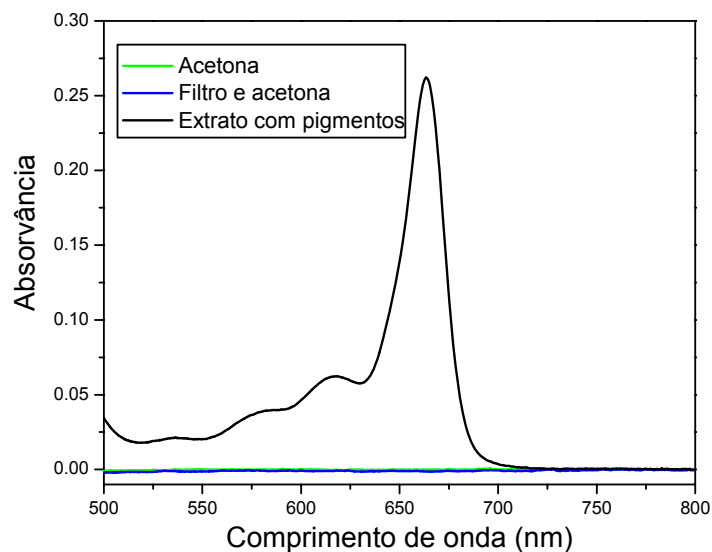


contribuição alóctone e lançamento de esgotos. A excreção de matéria orgânica, principalmente pelo fitoplâncton, durante a fase vegetativa e durante sua senescência, através da autólise das células, constitui uma importante fonte de carbono orgânico para a coluna de água. A matéria orgânica dissolvida influencia a dinâmica dos ecossistemas aquáticos de várias maneiras, pois desempenha importante papel como fonte de energia para bactérias e algas cianofíceas, sendo importante na cadeia alimentar. Atua também como agente de interferência na fotossíntese dos organismos aquáticos. Essa interferência ocorre através de alterações qualitativas e quantitativas das interações da luz solar com a coluna de água. Exerce papel fundamental no crescimento de certas algas e bactérias, pois uma fração da composição desta matéria orgânica é constituída por vitaminas.

Geralmente, a biomassa fitoplanctônica presente em ambientes aquáticos é avaliada com base nas concentrações de clorofila-a, que pode ser determinada experimentalmente (LexEngel e Poggiani, 1991; Murray *et al.*, 1986; Parsons *et al.*, 1984; Holm *et al.*, 1978).

O método empregado para determinar a concentração de pigmentos clorofilados e de feopigmentos presentes em águas naturais é baseado no conhecimento dos valores de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) desses compostos. Suas concentrações são avaliadas empregando-se espectrometria de absorção molecular na região do visível.

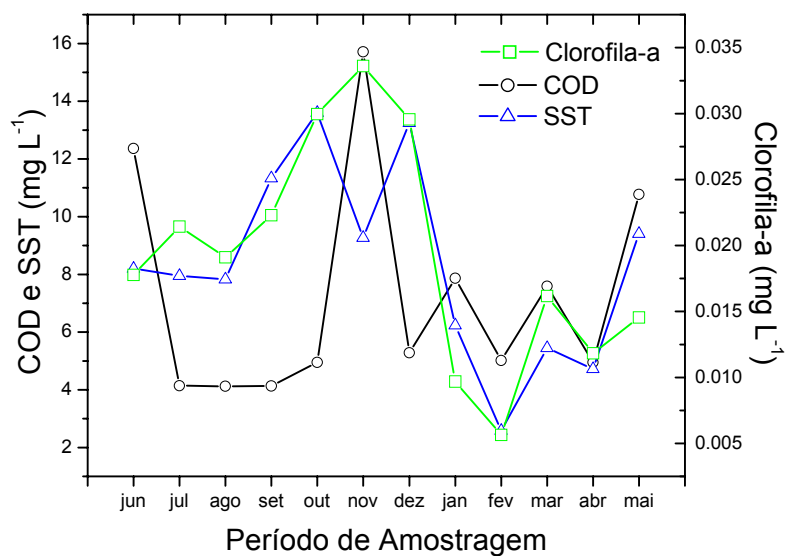
A Figura 15 representa um espectro característico para a clorofila-a extraída das microalgas do reservatório, juntamente com espectros controle.



**Figura 15.** Espectros obtidos para a clorofila-a (—) extraída das microalgas do reservatório, controle do filtro de fibra de vidro (—) e controle empregando acetona (—).

O espectro de absorção molecular obtido para o extrato contendo clorofila-a mostrado na Figura 15 permite observar a ocorrência de três picos de absorção distintos e característicos do sistema em estudo, localizados em 630, 645 e 663 nm. Estes valores de comprimento de onda caracterizam as regiões de absorção de luz pelos pigmentos encontrados na amostra contendo microalgas. O pigmento característico da clorofila-a apresenta um máximo de absorção em 663 nm. Este comprimento de onda é aquele que apresenta maior intensidade de absorção. Devem ser considerados também os valores de absorbância em 630 e 645 nm, devido à região de absorção dos pigmentos característicos da clorofila-b e clorofila-c, os quais são necessários para a quantificação da concentração real de clorofila-a, conforme mostra a Equação 10 (LexEngel e Poggiani, 1991; Sartory, 1985; Parsons *et al.*, 1984; Holm *et al.*, 1978).

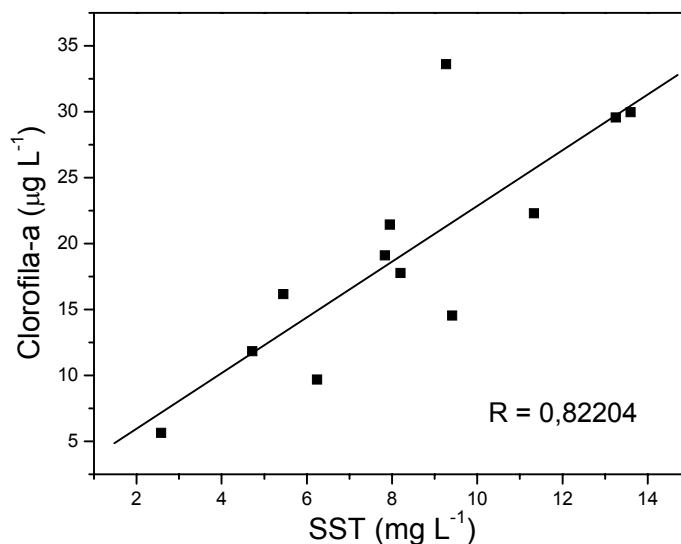
A Figura 16 mostra os valores de clorofila-a determinados para cada uma das amostras coletadas no reservatório, juntamente com os valores de sólidos suspensos totais e carbono orgânico dissolvido.



**Figura 16.** Valores de clorofila-a, carbono orgânico dissolvido (COD) e sólidos em suspensão (SST) nas águas do reservatório, durante o período de amostragem.

Observa-se na Figura 16 que as maiores concentrações de clorofila-a foram observadas nos meses de outubro, novembro e dezembro de 2004, o que corresponde aos meses onde os teores de SST e COD também foram os mais elevados.

Uma importante relação foi observada entre os valores de clorofila-a e de sólidos em suspensão, conforme pode ser visto na Figura 17.



**Figura 17.** Variação da clorofila-a em função dos sólidos suspensos totais durante o período de amostragem.

A Figura 17 evidencia uma interessante característica do reservatório, na medida em que se mostra clara a correlação existente entre os níveis de clorofila-a e sólidos suspensos. Estes resultados indicam que a biomassa fitoplanctônica é uma componente importante do material sólido em suspensão, demonstrando a natureza biótica do material sólido presente no reservatório.

Em uma das coletas de amostra, mais precisamente em março de 2005, também foram realizadas determinações de clorofila-a através do uso do FluoroProbe.

Em uma primeira análise, determinou-se o valor de clorofila-a e o perfil da comunidade de fitoplânctons no ponto de coleta mensal. Na Tabela 4 está apresentado um resumo do perfil da classificação das algas e o valor médio de clorofila-a encontrado nas medidas realizadas no mesmo ponto de coleta das amostras mensais.

**Tabela 4.** Classificação e valores de concentrações fitoplanctônicas e de clorofila-a medidas *in situ* no Reservatório do Iraí e concentração de clorofila-a determinada no laboratório.

Espécies	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	
	Medidas <i>in situ</i>	Medidas no laboratório
Clorófitas	1,58	
Cianófitas	5,99	As microalgas não foram classificadas
Heterocontófitas e Dinófitas	3,31	
Criptófitas	1,16	
Clorofila-a	12,03	12,58

Como evidencia a Tabela 4, o perfil da comunidade fitoplanctônica no ponto de coleta apresenta maior concentração da espécie denominada cianófitas, mais conhecida como cianobactéria. O valor encontrado para clorofila-a, medido *in situ* com o FluoroProbe, foi de  $12,03 \mu\text{g L}^{-1}$ , mostrando-se bastante concordante com o valor determinado no laboratório, de  $12,58 \mu\text{g L}^{-1}$ . É importante considerar que as medidas realizadas por diferentes técnicas apresentaram valores muito próximos, permitindo concluir que a medida realizada com o FluoroProbe para determinar clorofila-a fornece valores confiáveis do ponto de vista analítico, uma vez que apresentou uma diferença de apenas 4,4% do valor encontrado através da espectrometria de absorção molecular na região do visível.

Embora os resultados observados para os parâmetros relativos à qualidade de águas não demonstrem que o reservatório receba quantidades significativas de esgoto doméstico, suas águas sofrem com frequência de um processo de florescimento excessivo de algas. Trata-se, portanto, de um local que se caracteriza como um ambiente aquático eutrofizado. A fotografia apresentada na Figura 18, mostrada a seguir, evidencia uma situação de intensa floração de microalgas no Reservatório do Iraí, característica freqüente dos meses mais quentes do ano, onde são encontradas as mais altas densidades populacionais fitoplanctônicas.



**Figura 18.** Fotografia do Reservatório do Iraí tirada em novembro de 2005, mostrando uma situação de florescimento massivo de microalgas.

O processo de eutrofização é caracterizado pelo aumento da concentração de nutrientes, especificamente fósforo e nitrogênio, nos ecossistemas aquáticos, que tem como consequência o aumento de suas produtividades. No Reservatório do Iraí, este fenômeno pode ser atribuído às características da bacia de drenagem do reservatório. Em toda a área ocorre, provavelmente, a drenagem de águas superficiais de origem rural, que carregam para o reservatório quantidades expressivas de fósforo e nitrogênio contidos em fertilizantes agrícolas. Além disso, outros autores também mencionam o aporte de esgoto a partir do Sistema Penitenciário localizado na Área de Proteção Ambiental (APA) do Iraí. Existem ainda cerca de 800 casas localizadas na região, e em menor intensidade, o reservatório também está sujeito ao aporte de esgoto industrial produzido na área de influência da captação (Andreoli *et al.*, 2000; Fernandes e Lagos, 2003; Gazeta do Povo, 2003). Além desses aspectos, um outro fator que deve contribuir para o elevado nível de eutrofização das águas do Reservatório do Iraí é a baixa profundidade média do lago, em torno de 5 m. Como o reservatório se estende por uma área bastante ampla, é bastante provável que a luz solar seja capaz de penetrar em uma profundidade expressiva da coluna de água, fazendo com que a

zona eufótica seja predominante na mesma. A baixa profundidade também deve minimizar a ocorrência dos processos de estratificação da coluna de água, também prejudicados pela ocorrência praticamente constante de ventos, permitindo assim que os nutrientes responsáveis pela eutrofização estejam constantemente disponíveis para a comunidade fitoplanctônica do lago (Esteves, 1998; Odum, 1988).

Esteves (1998) cita que nos lagos em adiantado estágio de eutrofização observa-se nos meses mais quentes do ano altas densidades populacionais de algas, que se constituem nas florações ou chamados “blooms”. A presença das cianobactérias em concentrações mais elevadas que as demais espécies apóia a evidência da eutrofização neste ambiente aquático. Uma evidência que caracteriza este fato é a fotografia mostrada na Figura 18, obtida no final do mês de novembro, quando as temperaturas ambientes médias eram de cerca de 30°C.

#### **4.2 Otimização da Metodologia para Determinação de Cobre e Zinco por Voltametria de Redissolução Anódica**

Inicialmente, foi necessário implantar os métodos relacionados à determinação dos metais cobre e zinco, em nível de traço. Embora o método para a determinação de cobre estivesse efetivamente implantado em nosso laboratório, em virtude do desenvolvimento de outros projetos de pesquisa, este trabalho é pioneiro em relação a estudos envolvendo o metal zinco. Além disso, as concentrações de cobre e zinco nas águas do Reservatório do Iraí são significativamente inferiores àsquelas observadas para outros rios da RMC, que têm sido objeto freqüente de estudos conduzidos no âmbito do Grupo de Química Ambiental da UFPR. Assim sendo, foi necessário realizar um trabalho prévio de adequação dos métodos analíticos rotineiramente utilizados em nosso laboratório às características do ambiente a ser estudado no desenvolvimento desta dissertação.

Em função das baixas concentrações determinadas nas amostras de águas provenientes do reservatório, a primeira etapa deste projeto consistiu em desenvolver um trabalho voltado para a otimização das condições experimentais.

Com o objetivo de encontrar o melhor eletrólito de suporte, que pudesse aliar a menor interferência possível, em função da possibilidade da presença de impurezas nos ácidos e sais utilizados, e a melhor resolução dos voltamogramas relativos às redissoluções do cobre e zinco, quatro eletrólitos de suporte foram testados:  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{KCl}$  e  $\text{HCl}$ .

Em sistemas eletroquímicos o eletrólito de suporte é um eletrólito que, adicionado em altas concentrações, pode conferir à solução e à interface em estudo uma série de propriedades. Tais propriedades, em geral, são resultantes da manutenção da força iônica alta e constante da solução, o que, simplifica a análise dos sistemas eletroquímicos (Agostinho *et al.*, 2004).

O eletrólito de suporte deve, em princípio, apresentar as seguintes características: alta solubilidade, alto grau de ionização e ser estável química e eletroquimicamente no solvente a ser empregado. Estabilidade química do eletrólito de suporte refere-se as suas espécies químicas não reagirem com outras espécies presentes na solução, sejam elas eletroativas ou não, enquanto a estabilidade eletroquímica implica em admitir que o eletrólito não seja oxidado nem reduzido eletroliticamente em toda a faixa de potencial de interesse a que as interfaces em estudo forem submetidas. Com relação às suas aplicações, verifica-se que são bastante amplas, pois mantém os coeficientes de atividade praticamente constantes, o número de transporte da espécie eletroativa praticamente igual a zero, diminui a espessura da dupla camada elétrica, mantém a viscosidade, o coeficiente de difusão e o número médio de ligantes constantes (Agostinho *et al.*, 2004).

Em meios aquosos são muito empregados, como eletrólitos de suporte, sais que, além das propriedades mencionadas anteriormente, não apresentem hidrólise significativa e nem formem complexos com íons em solução. Podem ser citados, em meio aquoso, os percloratos, nitratos e sulfatos de sódio e de potássio. Em meios aquosos alcalinos dá-se preferência aos hidróxidos de sódio e de potássio. Alguns autores consideram eletrólito de suporte um sistema tamponante como, por exemplo, citrato, fosfato, acetato, borato, quando se faz



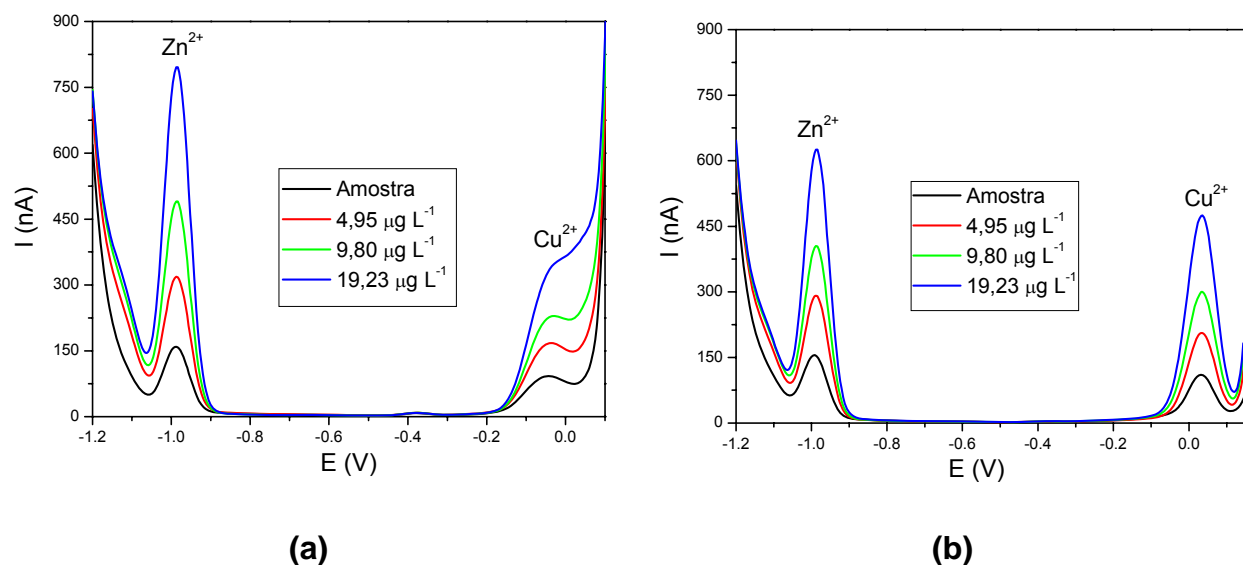
necessário manter constante, além da força iônica, o pH da solução aquosa (Agostinho *et al.*, 2004).

Para a realização desta dissertação, os eletrólitos de suporte foram escolhidos em função das particularidades do sistema em consideração e dos objetivos estabelecidos para o trabalho. Desta maneira, testou-se  $\text{HNO}_3$  e  $\text{HCl}$  nas determinações das frações total dissolvida e total recuperável dos metais e  $\text{KNO}_3$  e  $\text{KCl}$  nas determinações das concentrações dos mesmos metais presentes na forma lábil.

Tradicionalmente, o  $\text{HCl}$  tem sido empregado como eletrólito de suporte nos procedimentos que envolvem as determinações das frações total dissolvida e total recuperável de cobre (Sodré e Grassi, 2003). Além disso, este ácido também é utilizado na preservação das amostras, logo após sua coleta. Esta preservação também se faz necessária e precede as determinações das frações dos metais mencionadas anteriormente. O  $\text{HCl}$  empregado nestas etapas tem sido purificado de acordo com procedimentos e técnicas descritas por Campos *et al.* (2002).

Neste trabalho de implantação da metodologia, ficou evidenciado que o  $\text{HCl}$  não se mostrava como a melhor opção para ser utilizado como eletrólito de suporte. Esta constatação baseia-se na baixa resolução dos voltamogramas obtidos quando se emprega este ácido, conforme mostra a Figura 19.

A Figura 19 apresenta as diferenças entre os voltamogramas utilizando  $\text{HCl}$  e  $\text{HNO}_3$  como eletrólitos de suporte.



**Figura 19.** Voltamogramas referentes à adição de padrões de cobre e zinco a uma solução contendo  $4,95 \mu\text{g L}^{-1}$  destes metais. Parâmetros da análise voltamétrica:  $E_{\text{dep}}$ :  $-1,2 \text{ V}$  (vs Ag/AgCl);  $E_i$ :  $-1,2 \text{ V}$  e  $E_f$ :  $0,15 \text{ V}$ ;  $t_{\text{dep}}$ :  $300 \text{ s}$ ; amplitude do pulso:  $50 \text{ mV}$ ; velocidade de varredura:  $8 \text{ mV s}^{-1}$ ; purga entre as adições:  $180 \text{ seg}$ . **(a)** eletrólito de suporte: HCl; **(b)** eletrólito de suporte:  $\text{HNO}_3$ .

A Figura 19a evidencia a baixa resolução do voltamograma obtido na presença de HCl, especialmente em função da assimetria observada para o pico do cobre, que ocorre em torno de  $-0,04 \text{ V}$ . De fato, a literatura relata que a faixa de trabalho, na voltametria, é dependente não apenas do material do eletrodo de trabalho, mas igualmente do meio em que ele encontra-se imerso. Frequentemente, esta faixa de trabalho é limitada por dois processos eletródicos. O primeiro deles, em potenciais mais anódicos, está representado pela ocorrência de correntes relativamente elevadas, devido à oxidação da água para formar moléculas de oxigênio. Em potenciais mais negativos, por outro lado, correntes significativamente elevadas são geradas em função da redução da água, para formar hidrogênio (Skoog *et al.*, 2002; Aleixo, 2003).

Outra possibilidade de interferência, no caso de análises voltamétricas baseadas na redissolução anódica, diz respeito a possível oxidação do mercúrio, que ocorre ao redor de  $+0,0 \text{ V}$ , que também produz correntes de magnitudes consideráveis (Harris, 1998).

Como as concentrações de cobre presentes nas amostras de água do Reservatório do Iraí são da ordem de poucos microgramas por litro, ocorre um deslocamento do pico do cobre para potenciais ainda mais anódicos, o que compromete mais a análise, conforme pode ser observado na Figura 19a.

Para contornar estas dificuldades, utilizou-se o  $\text{HNO}_3$  como agente de preservação das amostras, no processo de digestão fotoquímica das mesmas (Sodré *et al.*, 2004) e igualmente como eletrólito de suporte. Observa-se, portanto, que o uso deste ácido, em todas as três etapas do procedimento analítico, resultou em uma baixa contaminação da amostra e também em uma resolução satisfatória dos voltamogramas obtidos, como pode ser confirmado na Figura 19b.

A Tabela 5 mostra resultados para um teste de recuperação dos metais cobre e zinco totais dissolvidos, presentes em uma solução contendo aproximadamente  $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$  destes metais.

**Tabela 5.** Teste de recuperação para cobre e zinco em uma solução contendo aproximadamente  $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$  dos metais, utilizando diferentes eletrólitos.

Eletrólitos de suporte	Fração recuperada (%)	
	Cobre	Zinco
$\text{HNO}_3$	102	90
HCl	80	70,8

Os resultados mostrados na Tabela 5 demonstram que os níveis de recuperação dos metais são mais satisfatórios quando se emprega o  $\text{HNO}_3$  como eletrólito suporte. Para soluções contendo este eletrólito foram obtidos percentuais de recuperação de 102% para o cobre e 90% para o zinco. Quando se utiliza o HCl como eletrólito de suporte o percentual de recuperação é significativamente inferior, ou seja, 80% para o cobre e cerca de 71% para o zinco. Em função de todos os resultados descritos anteriormente, o  $\text{HNO}_3$  passou a ser utilizado como eletrólito de suporte e agente de preservação das amostras, nas determinações das frações total recuperável e total dissolvida dos metais. As determinações voltamétricas dos metais nas frações total recuperável e total dissolvida foram

realizadas durante os meses de junho e julho de 2004, até dar início a utilização da Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (EAA-FG).

Quando se determinam as frações lábeis destes metais, a amostra não pode ser acidificada, uma vez que isto provocaria alterações na distribuição das espécies metálicas presentes em solução, alterando conseqüentemente a especiação química dos metais. Nesse sentido, fez-se necessária à utilização de um eletrólito inerte na realização das medidas voltamétricas. Desta forma, foram conduzidos experimentos empregando-se  $\text{KNO}_3$  e  $\text{KCl}$  como eletrólito de suporte.

Resultados bastante semelhantes àqueles obtidos para os ácidos nítrico e clorídrico foram observados quando se utilizou nitrato de potássio e cloreto de potássio.

Uma vez mais se observou que a presença de íons cloreto deslocava o potencial de oxidação da água para regiões mais catódicas, prejudicando a resolução dos voltamogramas, especialmente em relação ao pico do cobre. Ao contrário, o uso de  $\text{KNO}_3$  resultou em voltamogramas com picos bem definidos e excelentes percentuais de recuperação. Assim sendo, as determinações envolvendo as espécies metálicas lábeis passaram a ser conduzidas na presença de  $\text{KNO}_3$  como eletrólito de suporte.

Simultaneamente a implantação do eletrólito de suporte, foi realizada a escolha de determinados parâmetros. Um deles, importante na voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial, é o valor da amplitude do pulso. A escolha adequada deste parâmetro implica na resolução do voltamograma, pois aumentando a amplitude do pulso aumenta-se o valor da corrente, sendo então maior a sensibilidade. A escolha da amplitude é um compromisso entre o aumento da sensibilidade e a perda de resolução. Existem situações em que a determinação de mais de uma espécie está envolvida, como no início deste trabalho, quando era realizada a determinação dos metais cobre e zinco nas frações total recuperável e dissolvida. Nestas condições é considerada a amplitude adequada, aquela que fornecer um compromisso entre a maior corrente de pico obtida, que permite maior sensibilidade e a melhor separação entre eles, permitindo uma resolução maior. Geralmente escolhe-se um valor entre 10 e 100

mV (Aleixo, 2003). Para as análises realizadas, utilizou-se 50 mV, por ser o valor mais indicado para processos eletródicos envolvendo dois elétrons.

Outro parâmetro importante a ser determinado é a velocidade de varredura. No caso da voltametria de pulso diferencial o valor máximo que pode ser usado é de  $10 \text{ mV s}^{-1}$  (Aleixo, 2003). O valor que apresentou uma melhor resolução para os picos de cobre e zinco, foi de  $8 \text{ mV s}^{-1}$ .

Os picos voltamétricos fornecem uma informação qualitativa, que é o valor do potencial de pico,  $E_p$ , e uma informação quantitativa, que é a corrente de pico,  $I_p$ . Para obtenção de uma curva de calibração normalmente constrói-se a partir dos valores das correntes de pico vs. as concentrações da espécie eletroativa, correspondentes a eles. Outra alternativa que pode ser utilizada também é a área sob o pico vs. a concentração. Esta situação gera melhores resultados quando ocorrem fenômenos de adsorção, por exemplo, alterando a forma do pico de uma medida para outra. Sendo assim, a altura muda, mas a área permanece constante. Não há uma regra definida para a escolha, de modo que ambas podem ser testadas para verificar qual delas é a mais adequada (Locatelli, 2004).

#### **4.3 Especificação Química dos Metais Cobre e Zinco**

Os metais cobre e zinco são elementos essenciais para certas atividades biológicas, mas podem ser tóxicos em elevadas concentrações. Para avaliar o destino e os efeitos ecotoxicológicos de metais em águas naturais, é essencial determinar a especiação e a concentração do metal presente na forma iônica livre. Determinar a concentração do metal livre é o parâmetro chave para o conhecimento da reatividade, biodisponibilidade e efeitos do metal no ambiente aquático.

A análise de especiação consiste em avaliar a distribuição do metal entre várias formas ou espécies. A especiação física distingue o metal entre as frações dissolvida e particulada, enquanto a especiação química avalia a distribuição do metal entre as formas complexada ou não-complexada e a distinção entre diferentes estados de oxidação. O estudo da especiação fornece informações

importantes do ponto de vista ecotoxicológico, pois permite prever os efeitos tóxicos provocados pela presença de metais em ambientes aquáticos, ou seja, àqueles considerados biodisponíveis (Twiss *et al.*, 2001; Twiss *et al.*, 2000). A especiação química de metais tem sido extensivamente estudada por titulação direta de amostras de águas naturais com metais traço (Ruzic, 1996). Desta forma, em ambientes aquáticos a especiação possui uma grande influência na biodisponibilidade dos metais (Meylan *et al.*, 2004).

A implantação de um protocolo de especiação dos metais cobre e zinco em amostras de águas naturais exige a definição de uma técnica analítica que permita a identificação e a quantificação de espécies lábeis na amostra. Dentre as técnicas descritas na literatura destacam-se aquelas baseadas na voltametria de redissolução, que podem fornecer dados quantitativos com excelentes limites de detecção, elevada sensibilidade analítica, (Bruland *et al.*, 2000) e boa correlação com a disponibilidade biológica do metal (Xue e Sigg, 1998).

Neste trabalho, a especiação de cobre e zinco foi realizada por voltametria de redissolução anódica com pulso diferencial e utilização de KNO<sub>3</sub> como eletrólito de suporte.

Ruzic (1982) propôs um método para a interpretação direta da titulação de águas naturais com metais. Esta metodologia está baseada no gráfico que relaciona a razão entre a concentração do metal livre e a concentração do metal complexado vs. a concentração do metal livre. A aplicação deste método, é baseado na complexação do metal-ligante com estequiometria 1:1. Este modelo, que posteriormente foi aprimorado por van den Berg-Ruzic, fornece as características de complexação dos metais, através da aplicação da Equação 11, já mostrada na parte experimental desta dissertação (van den Berg, 1979 e Ruzic, 1982).

$$\frac{[M']}{[ML]} = \frac{1}{K'_{ML} [L]_{TOTAL}} + \frac{1}{[L]_{TOTAL}} \cdot [M'] \quad (11)$$

Como mostra a Equação 11, para a obtenção das características de complexação, constrói-se um gráfico de  $[M']/[ML]$  vs.  $[M]$ . A equação da reta obtida através do gráfico de  $[M']/[ML]$  vs.  $[M]$  fornece os coeficientes angular e linear que correspondem aos valores de  $1/[L]_{TOTAL}$  e  $1/K' \cdot [L]_{TOTAL}$ , respectivamente.

Este modelo fornece quatro características de complexação, ou seja, a constante de estabilidade condicional ( $K'_{ML}$ ), a concentração de sítios de ligação disponíveis ( $[L]_{TOTAL}$ ), a concentração do metal complexado ( $[ML]$ ) e a concentração do mesmo metal na forma lábil ( $[M']$ ).

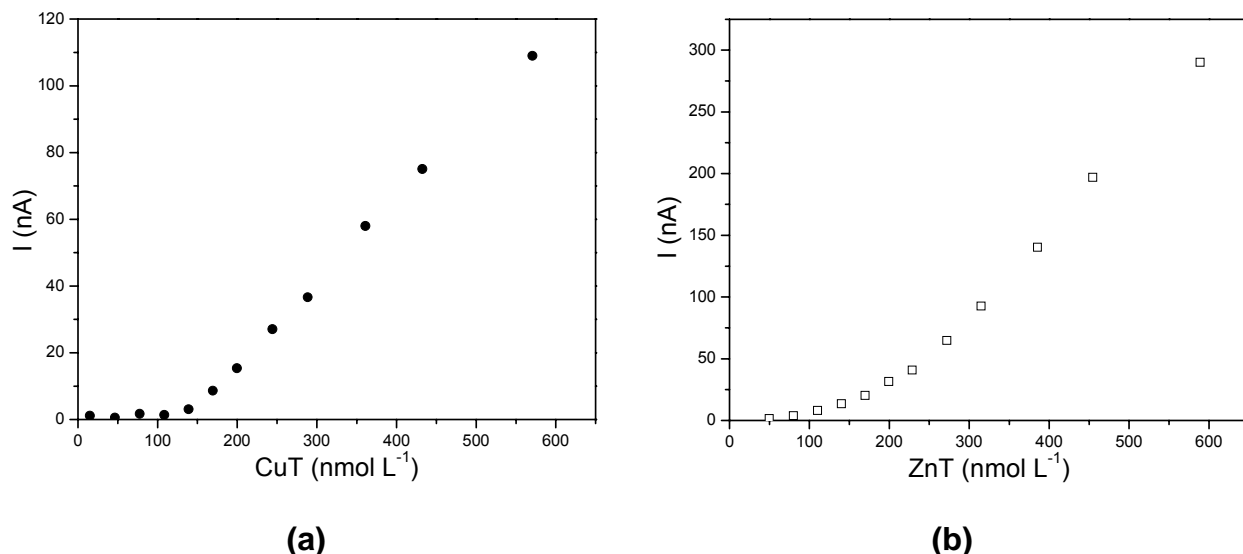
Na técnica utilizada para se obter a capacidade de complexação do cobre, cádmio e chumbo, desenvolvida por Mylon *et al.* (2003), a amostra foi titulada com soluções-padrão dos metais, separadamente, até que todos sítios de ligação disponíveis presentes na amostra tivessem sido ocupados. Nesta dissertação, uma abordagem semelhante foi empregada tanto para cobre como para o zinco. A escolha das condições experimentais aqui descritas tem como principais características a simplicidade de realização das medidas experimentais, o uso de um mesmo procedimento para ambos os metais, assim como o emprego de um modelo que prevê o comportamento de uma única classe de sítios de ligação. Em função dos relatos contidos na literatura, acredita-se que esta abordagem possa descrever com relativa fidelidade o comportamento de agentes complexantes frente aos metais cobre e zinco em sistemas aquáticos naturais.

Xue e colaboradores (1995) determinaram as concentrações de cobre e zinco em amostras de água de um ambiente eutrofizado, o Lago Greifen, na Suíça. A especiação do cobre foi realizada através da técnica de competição de ligantes, empregando catecol como ligante de competição, utilizando voltametria de redissolução catódica. A especiação do zinco foi realizada através da competição de ligantes, porém com EDTA, utilizando voltametria de redissolução anódica.

No presente estudo, para se obter a capacidade de complexação dos metais cobre e zinco, a amostra foi titulada separadamente para cada metal, fundamentada na Equação 11, descrita anteriormente. A amostra, inicialmente filtrada e contendo apenas  $KNO_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  como eletrólito de suporte, foi titulada

com soluções padrão contendo  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ , preparados a partir de padrões de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ .

A Figura 20, apresentada a seguir, refere-se aos gráficos obtidos para as titulações de uma amostra de água do Reservatório do Iraí com os metais cobre e zinco, separadamente.



**Figura 20.** Voltamogramas referentes às titulações da amostra de água do Reservatório do Iraí. **(a)** Titulação com  $\text{Cu}^{2+}$  ( $500 \mu\text{g L}^{-1}$ ); **(b)** titulação com  $\text{Zn}^{2+}$  ( $500 \mu\text{g L}^{-1}$ ). I:  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em  $\text{KNO}_3$ ;  $E_{\text{dep}}$ :  $-1,2 \text{ V}$  (vs  $\text{Ag/AgCl}$ );  $\text{Cu}^{2+}$ :  $E_i$ :  $-0,6 \text{ V}$  e  $E_f$ :  $0,15 \text{ V}$ ;  $\text{Zn}^{2+}$ :  $E_i$ :  $-1,2 \text{ V}$  e  $E_f$ :  $-0,6 \text{ V}$ ;  $t_{\text{dep}}$ :  $600 \text{ s}$ ; amplitude do pulso:  $50 \text{ mV}$ ; velocidade de varredura:  $8 \text{ mV s}^{-1}$ ; purga entre as adições:  $180 \text{ seg.}$ ; tempo de equilíbrio:  $20 \text{ min.}$

Os gráficos da Figura 20 foram construídos a partir dos valores de intensidade de corrente de pico (nA) geradas após cada adição da solução titulante e das concentrações ( $\text{nmol L}^{-1}$ ) do metal total adicionado em cada ponto da titulação, considerando, em ambos os casos, a concentração do metal dissolvido já presente na amostra.

Como se pode observar a partir dos comportamentos descritos nos gráficos, no início da titulação praticamente todo o metal adicionado está sendo complexado por sítios de ligação disponíveis presentes na amostra, o que resulta numa variação da corrente que é praticamente negligenciável, pois o metal

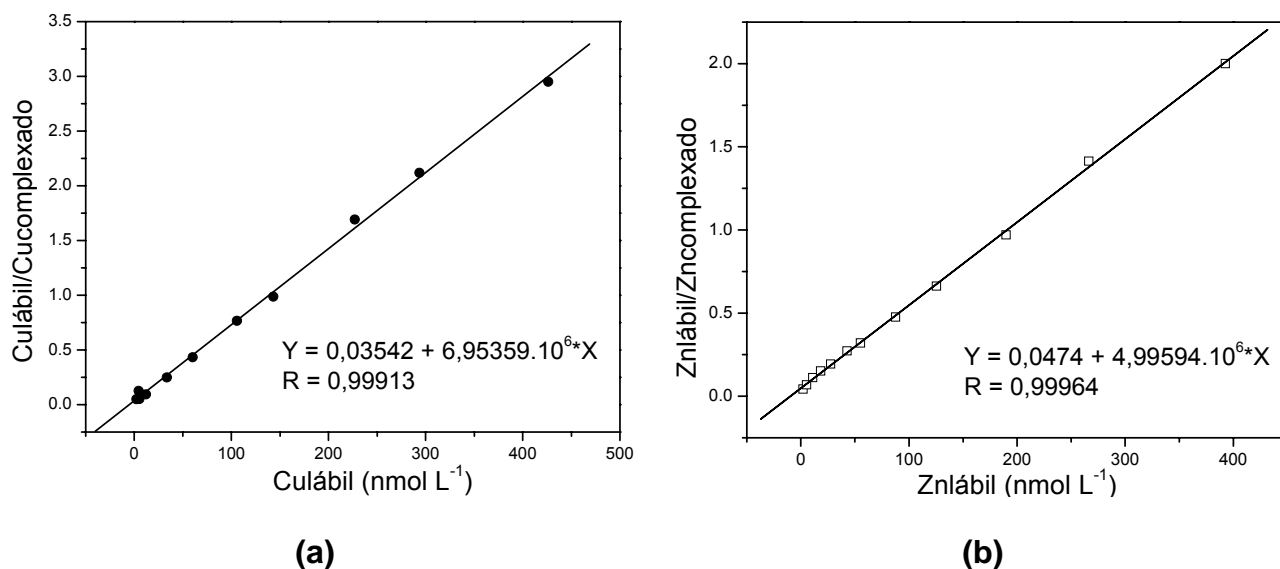


complexado não é eletroativo. A partir de uma determinada concentração do metal adicionado, a curva passa a apresentar um comportamento crescente linear, ou seja, a corrente aumenta proporcionalmente à medida que se adiciona o metal. Isto significa que após o tempo de equilíbrio de cada adição (20 minutos), o metal lábil (eletroativo) presente no meio é detectado, sendo responsável pela corrente gerada. Após atingir a capacidade de complexação, que corresponde à faixa linear do gráfico, todo o metal adicionado encontra-se, portanto, na forma eletroativa. Tomando-se os pontos da faixa linear da curva de titulação é construído um novo gráfico, agora relacionando a corrente de pico (nA) em função da concentração total do metal ( $\text{nmol L}^{-1}$ ). A partir destes dados é possível determinar o valor do coeficiente angular da reta obtida, que por sua vez é utilizado no cálculo da fração lábil do metal para cada ponto da titulação.

O cálculo da concentração do metal lábil é realizado através do quociente entre a corrente correspondente a cada ponto da curva e o coeficiente angular, como mostrado na Equação 7, na parte experimental.

De posse destes resultados, determina-se em seguida o valor da concentração do metal complexado. Estes valores são calculados através da diferença entre a concentração do metal total (metal total dissolvido originalmente presente na amostra somada ao metal adicionado) e concentração do metal lábil, conforme a Equação 8.

Finalmente, é construído um novo gráfico, conforme a Equação 11, que gera os valores necessários para se aplicar o modelo, como exemplificam os gráficos a seguir.



**Figura 21.** Determinação das capacidades de complexação, baseada na Linearização de Ruzic, da amostra de água do Reservatório do Iraí. **(a)** cobre; **(b)** zinco.

A partir da equação da reta obtida nas curvas mostradas na Figura 21, determinam-se os valores dos coeficientes linear e angular, podendo-se determinar os valores de concentração dos sítios de ligação disponíveis e da constante de estabilidade condicional.

Os coeficientes de correlação obtidos para ambas as retas apresentadas nos gráficos contidos na Figura 21, ou seja, 0,99913 para o cobre, e 0,99964 para o zinco, típicos de titulações envolvendo estes dois metais, evidenciam que os dados gerados nas titulações apresentam elevada confiabilidade, permitindo inferir uma validação dos protocolos analíticos relacionados à determinação da especiação química destes metais (Scarponi *et al.*, 1996).

As concentrações dos metais cobre e zinco livres foram determinadas através da aplicação do programa MineqL+. Este programa permite o cálculo das concentrações das espécies presentes através do modelo de especiação baseado no comportamento dos metais em um sistema em equilíbrio (MineqL+, 2005).

Diversas técnicas voltamétricas têm sido aplicadas para a análise de especiação de metais. Uma das vantagens da utilização da Voltametria de Redissolução Anódica (VRA) é sua possibilidade de realizar a pré-concentração

da substância a ser determinada e chegar a limites de detecção inferiores a  $10^{-7}$  –  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> (van Leeuwen *et al.*, 2005).

Xue e colaboradores (1995) e van den Berg (1979) têm empregado técnicas envolvendo a competição de ligantes e a voltametria de redissolução catódica. Cabanis e Shuman (1988) desenvolveram um método de avaliação onde utilizam eletrodos íon-seletivos. No trabalho realizado por Sodré e Grassi (2003) para avaliar a especiação química do cobre em  guas de rios localizados na RMC, empregou-se o método de competição de ligantes descrito por Scarano *et al.* (1992), em conjunto com a Voltametria de Redissolução Anódica. Locatelli e Torsi (2001) determinaram simultaneamente Cu<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> e Mn<sup>2+</sup> através da voltametria de redissolução anódica (VRAPD) e As<sup>3+</sup> e Se<sup>4+</sup> por voltametria de redissolução catódica (VRCPD). No estudo de Locatelli e Torsi (2001) foram avaliadas diversas matrizes, tais como, água do mar, algas, moluscos, e sedimentos. Os resultados obtidos por estes autores evidenciou que a voltametria, juntamente com o método de adição de padrão, é um método analítico válido para determinar simultaneamente vários metais que possuem potenciais de pico similares, e conseqüentemente, muitos problemas de interferência, em uma mesma solução com diferentes concentrações. Segundo van Leeuwen e colaboradores (2005) a competição através da troca de ligantes por voltametria de redissolução adsortiva, CLE-AdSV, tem sido bastante utilizada para determinar a especiação de metais.

Meylan e colaboradores (2004) realizaram um estudo que comparou medidas *in situ* (envolvendo DGT) das concentrações de cobre e zinco lábeis com medidas de especiação utilizando CLE com VRAPD para o zinco e VRCPD para cobre, em sistemas de águas naturais. É de grande interesse comparar as concentrações das frações de metal dissolvido medidas através da DGT e da voltametria catódica e anódica, embora não possam ser esperados resultados idênticos para estas técnicas, pois são baseados em princípios diferentes.

Utilizando DGT, Twiss e Moffett (2002) avaliaram a concentração de cobre em locais com diferentes graus de poluição, nos EUA. Nas  guas pr stinas de Vineyard (Massachussets) a concentração total de cobre encontrada foi de 6 nmol

L<sup>-1</sup>. No porto do Cabo Cod, no mesmo estado, de acordo com a época de atividades no local, a concentração de cobre variou entre 12 e 64 nmol L<sup>-1</sup>, como também um grande estuário poluído, o Rio Elizabeth (no estado da Virgínia), apresentou concentrações de 44-58 nmol L<sup>-1</sup>. Outro porto bastante poluído, em San Diego (Califórnia), apresentou concentrações de cobre variando de 23 a 103 nmol L<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos por Twiss e Moffett (2002) mostram que as grandes variações de concentrações, desde águas prístinas até águas contaminadas, confirmam a precisão nos valores, demonstrando desta forma, que DGT é uma técnica promissora para avaliar a especiação de metais.

Todos estes métodos resultam em dados que têm sido avaliados de forma bastante diversificada, porém muitos deles não permitem uma avaliação comparativa referente ao comportamento de diferentes metais, pois utilizam diferentes abordagens, como por exemplo, diferentes tipos de ligantes de competição. Além disso, a escolha do número apropriado de tipos específicos de sítios de ligação também tem sido uma fonte de controvérsia.

Portanto, a escolha da técnica adequada para realizar uma análise deve considerar os fatores que favoreçam um melhor resultado na sensibilidade e reprodutibilidade.

Cabe ressaltar que a avaliação da especiação destes metais através da voltametria de redissolução anódica, é inédita no contexto pesquisado, ainda não descrita na literatura. Pode-se constatar que a implantação da metodologia para a especiação dos metais cobre e zinco nas águas do Reservatório do Iraí apresentou-se bastante satisfatória, com resultados precisos e confiáveis no âmbito deste estudo.

#### **4.4 Comportamento de Cobre e Zinco nas Águas do Reservatório do Iraí**

A toxicidade de metais-traço reside principalmente na sua capacidade de interferir em processos enzimáticos e na sua pouca mobilidade no organismo em virtude do pequeno tamanho. Esta baixa mobilidade faz com que estes metais se acumulem, provocando profundas modificações no metabolismo, podendo causar

a morte do organismo afetado. Quanto à toxicidade, os metais-traço reagem diferenciadamente mesmo com organismos do mesmo grupo. O cobre, por exemplo é extremamente tóxico a algas e a maioria dos fungos. No entanto, existem espécies de fungos que crescem e até se reproduzem em soluções concentradas deste mesmo metal (Esteves, 1998; Round, 1983).

As Tabelas 6 e 7 apresentam, de forma sintetizada, os resultados obtidos para os teores de cobre e zinco totais recuperáveis, dissolvidos, complexados, lábeis e livres, estes últimos determinados com o auxílio do programa de especiação química MineqL+.

**Tabela 6.** Valores de concentração de cobre ( $\text{nmol L}^{-1}$ ), e distribuição deste metal nas frações recuperável, dissolvida, complexada, lábil e livre nas águas do Reservatório do Iraí.

Valores	CuTR	CuTD	CuL	Cu <sub>lab</sub>	Cu <sub>livre</sub>
mín - máx	11,12 – 29,89	9,17 – 24,40	3,79 – 22,68	0,59 – 7,11	0,19 – 3,44
média	20,43	16,67	13,75	2,92	0,93
mediana	21,07	15,74	14,18	1,84	0,73

CuTR: cobre total recuperável; CuTD: cobre total dissolvido; CuL: cobre complexado na fração dissolvida; Cu<sub>lab</sub>: cobre lábil; Cu<sub>livre</sub>: cobre livre.

**Tabela 7.** Valores de concentração de zinco ( $\text{nmol L}^{-1}$ ), e distribuição deste metal nas frações recuperável, dissolvida, complexada, lábil e livre nas águas do Reservatório do Iraí.

Valores	ZnTR	ZnTD	ZnL	Zn <sub>lab</sub>	Zn <sub>livre</sub>
mín - máx	44,01 – 133,61	31,28 – 119,56	23,30 – 83,63	1,54 – 82,76	1,63 – 98,0
média	65,77	57,73	43,85	13,88	15,09
mediana	51,80	49,75	41,80	4,86	3,24

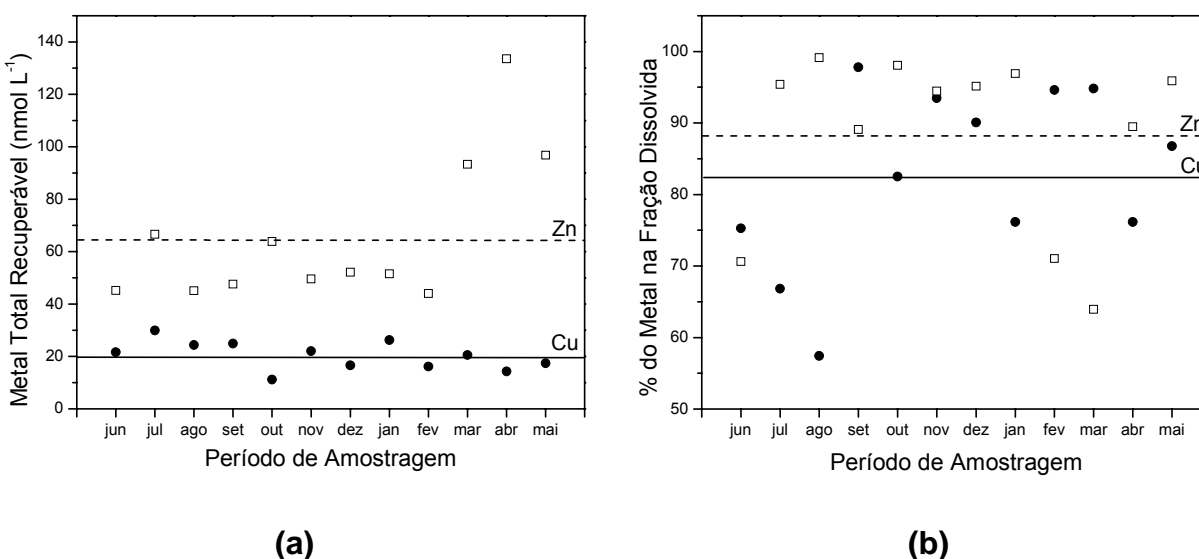
ZnTR: zinco total recuperável; ZnTD: zinco total dissolvido; ZnL: zinco complexado na fração dissolvida; Zn<sub>lab</sub>: zinco lábil; Zn<sub>livre</sub>: zinco livre.

Como mostra a Tabela 6, os valores determinados durante o período de amostragem, para as frações recuperável e dissolvida do cobre foram, em média, 20 e 16  $\text{nmol L}^{-1}$ , respectivamente. A fração lábil corresponde a 17% do cobre na

fração dissolvida. Os valores de zinco, observados na Tabela 7, foram sempre superiores aos de cobre, correspondendo em média a 65 e 57 nmol L<sup>-1</sup> nas frações recuperável e dissolvida, respectivamente. A concentração de zinco lábil corresponde a 24% do zinco presente na fração dissolvida.

Comportamento similar foi observado por Xue e Sigg (1994) e Xue *et al.* (1995) em lagos suíços eutrofizados. Nos estudos realizados por estes autores, a fração dissolvida de zinco variou de 10 a 40 nmol L<sup>-1</sup>, enquanto a de cobre de 7 a 20 nmol L<sup>-1</sup>.

A Figura 22a apresenta os resultados obtidos mensalmente, durante todo o período de amostragem, para as concentrações de cobre e zinco total recuperável. Na Figura 22b é mostrada a distribuição de ambos os metais entre as frações particulada e dissolvida, em termos percentuais.



**Figura 22.** (a) Valores de cobre (•) e zinco (□) total recuperável durante o período de amostragem, nas águas do reservatório; (b) Valores da porcentagem de cobre (•) e zinco (□) na fração dissolvida em função do período de amostragem, nas águas do Reservatório do Iraí.

A Figura 22a permite observar que os níveis de zinco total recuperável foram superiores, durante todo o período de amostragem, aos obtidos para cobre total recuperável. Estes resultados estão de acordo com a literatura, que evidencia

uma maior abundância do zinco em corpos aquáticos sob influência de atividades antrópicas (Velásquez *et al.*, 2002).

Este comportamento também foi observado em estudos realizados por Xue *et al.* (1997) em dois lagos eutrofizados; lagos Sempach e Greifen, na Suíça. Os valores de cobre e zinco encontrados no Lago Greifen foram, em média, da ordem de 20 e 30 nmol L<sup>-1</sup> respectivamente, e no Lago Sempach entre 5 e 10 nmol L<sup>-1</sup>. Estes valores variavam durante as estações e conforme a profundidade.

No estudo envolvendo metais pesados, realizado na bacia do Rio Guadiana, Espanha, uma região que tradicionalmente recebe aportes de poluentes de duas fontes principais, tanto de origem em atividades de mineração, quanto de atividades industriais – urbanas e de agricultura – as concentrações encontradas seguiram a ordem Zn>Cu>Pb>Cd (Alonso *et al.*, 2004).

A Figura 22b apresenta os teores de cobre e zinco encontrados na fração dissolvida, durante todo o período de coleta de amostras no reservatório. Observa-se, por exemplo, que o cobre tem uma afinidade ligeiramente superior, quando comparado ao zinco, pelo material particulado em suspensão. Enquanto cerca de 83% do cobre estão presentes na fração dissolvida, 88% do zinco são encontrados nesta fração. Estes resultados demonstram que o material particulado tem uma maior afinidade pelo cobre do que pelo zinco.

Em estudos nas águas do Reservatório Saint Germain les Belles, van Hullebusch e colaboradores (2003) determinaram que 84-99% do cobre dissolvido estava complexado organicamente.

Segundo van Hullebusch e colaboradores (2003) em águas naturais, o cobre possui alta afinidade pela matéria orgânica, por óxidos, carbonatos, assim como, pela fase coloidal e particulada.

Uma contribuição relevante em estudos de especiação de metais-traço em águas naturais é avaliação da partição destas espécies. A partir dos coeficientes de partição ( $K_D$ ) torna-se possível avaliar o grau de associação de metais junto ao material particulado e a presença dos mesmos na fração dissolvida, o que pode se constituir em informação importante em termos da residência de metais na coluna

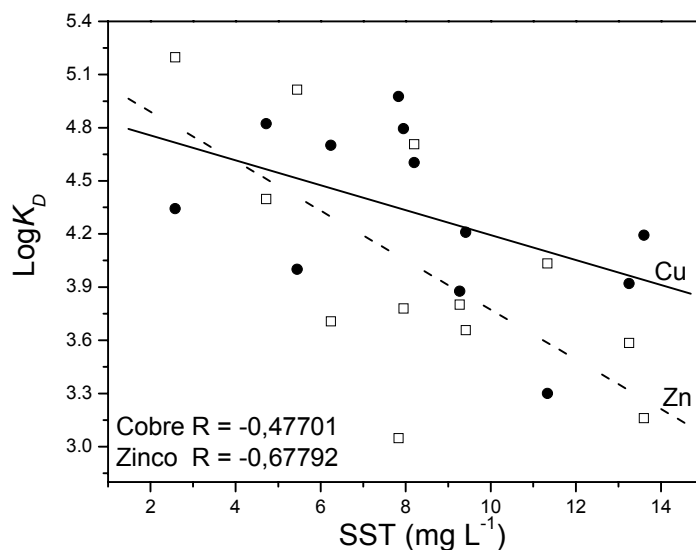
de água e igualmente de sua biodisponibilidade biológica. O valor de  $K_D$ , cuja unidade é  $L\ kg^{-1}$ , é determinado a partir da Equação 12.

$$K_D = \frac{C_p}{C_d} \quad (12)$$

Onde  $C_p$  é a concentração do metal no material particulado, em  $mg\ kg^{-1}$ , e  $C_d$  é a concentração do metal na fração dissolvida, em  $\mu g\ L^{-1}$ .

Partículas em suspensão tendem a sedimentar naturalmente, removendo da coluna de água aqueles metais que se encontram associados a este material, enquanto que metais na fração dissolvida podem ser mais facilmente transferidos para uma forma biodisponível.

A Figura 23 apresenta a relação existente entre os valores de  $\log K_D$  e sólidos suspensos totais, para os dois metais estudados.



**Figura 23.** Coeficientes de partição ( $K_D$ ) do cobre (●) e zinco (□) em função dos teores de sólidos suspensos totais para as águas do Reservatório do Iraí, durante o período de amostragem.

A partir da Figura 23 é possível observar que há uma distinção entre o comportamento do coeficiente de partição para o cobre e para o zinco, em função

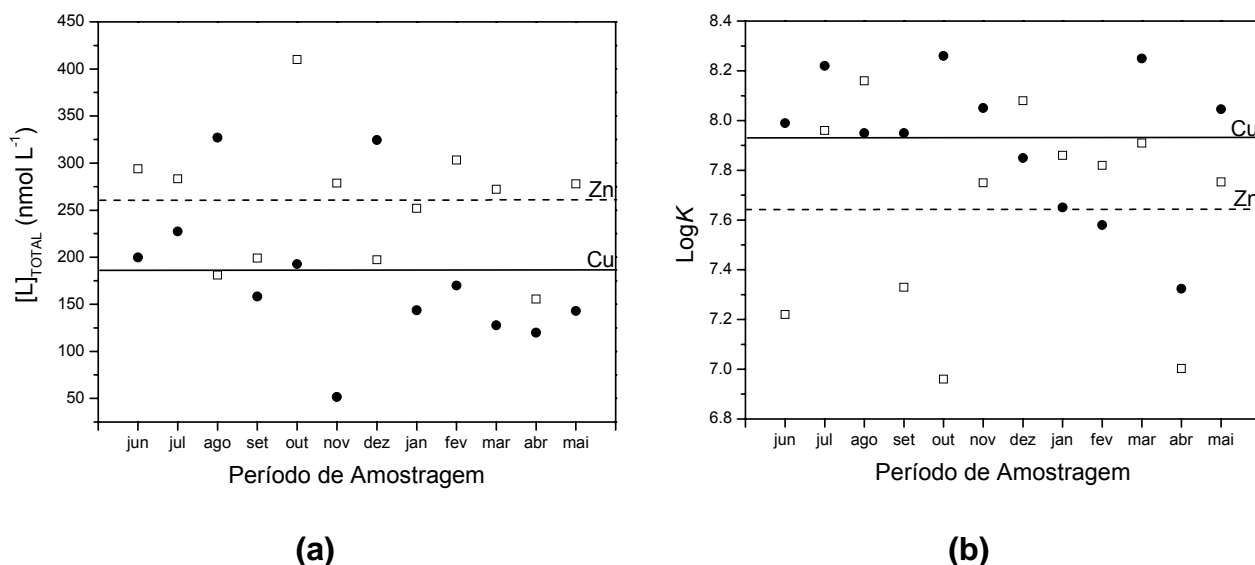


dos teores de sólidos em suspensão, apesar de ambos apresentarem uma correlação decrescente entre estes parâmetros.

A princípio, este comportamento decrescente pode parecer anômalo, pois o que se esperaria é que com um aumento nos níveis de sólidos suspensos totais aumentasse a associação dos metais cobre e zinco junto ao material particulado. Entretanto, o comportamento obtido neste trabalho tem sido relatado em diversos estudos que abordam a temática da partição de metais em ambientes aquáticos (Lu e Allen, 2001; Grassi *et al.*, 2000; Benoit e Rozan, 1999). Este comportamento pode ser explicado pelo chamado efeito de concentração de partículas (ECP). Considerando que a separação entre as frações particulada e dissolvida de componentes presentes em águas naturais baseia-se em uma definição operacional, ou seja, a partir da filtração da amostra em uma membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  de porosidade, ela está sujeita a limitações. Por exemplos, os colóides apresentam características típicas de material sólido, porém permeiam pela membrana de filtração e são contabilizados na fração dissolvida.

Como mostra a Figura 23, para a maioria das amostras o  $\text{Log } K_D$  para o cobre é maior que o  $\text{Log } K_D$  para o zinco. Este comportamento pode representar uma situação onde o zinco parece estar preferencialmente associado a sólidos de natureza coloidal, que passam pela membrana de filtração. Com base nestes aspectos, acredita-se que a remoção do metal a partir da coluna de água por sedimentação ocorra de forma mais acentuada para o cobre, em oposição ao comportamento observado para o zinco.

Na Figura 24 são apresentados os valores de capacidade de complexação frente ao cobre e zinco, isto é, as concentrações de sítios disponíveis para complexação, representados por  $[\text{L}]_{\text{TOTAL}}$ , assim como os valores das constantes de estabilidade condicionais, para os dois metais, em termos logarítmicos,  $\text{Log } K'$ , em função do período de amostragem. As linhas horizontais representam os valores médios para estes parâmetros.



**Figura 24. (a)** Concentrações de sítios disponíveis para o cobre (•) e zinco (□); **(b)** Valores de Log  $K'$  para os mesmos metais em função das amostras coletadas mensalmente.

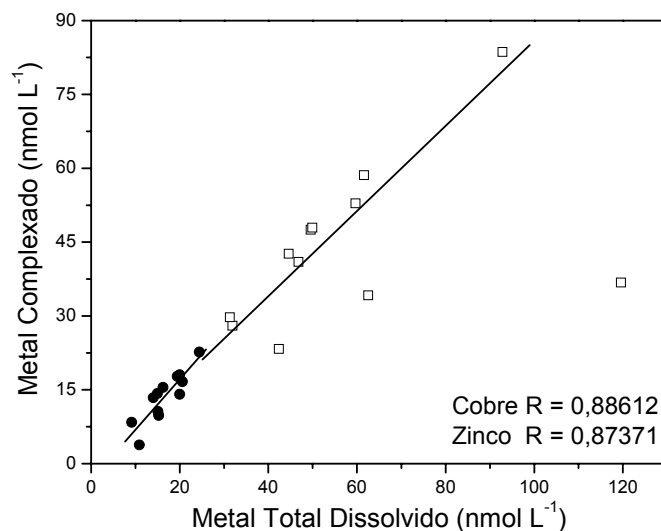
Observando a Figura 24a e comparando o comportamento das espécies capazes de complexar os dois metais, verifica-se que os agentes complexantes presentes nas águas do reservatório apresentam uma maior capacidade de complexação de zinco, quando comparado ao cobre. Em média, os valores de  $[L]_{TOTAL}$  para o zinco foram de  $258 nmol L^{-1}$ , enquanto que para o cobre foram de  $182 nmol L^{-1}$ . Este comportamento foi constante em praticamente todas as amostras coletadas mensalmente. Entretanto, quando observamos o Log  $K'$ , que representa a força da ligação metal-ligante (Figura 24b), o comportamento é inverso. De uma maneira geral, os valores de Log  $K'$  são superiores para o cobre.

Essa diferença pode ser explicada pelo fato do zinco estar presente em concentrações aproximadamente 3,5 vezes maiores que o cobre, nas águas do reservatório. Sendo assim, a existência de uma maior concentração de sítios disponíveis para complexar este metal pode indicar a liberação de excretados que sejam capazes de promover uma diminuição na concentração de zinco biodisponível. Por outro lado, observa-se que os sítios de ligação ocupados pelo cobre podem ser considerados mais fortes que aqueles ocupados pelo zinco.

Xue e colaboradores (1995) avaliaram a complexação do cobre e zinco através de experimentos envolvendo a competição entre os dois metais pelos sítios de ligação disponíveis. Os resultados demonstraram que o cobre – adicionado durante titulação da amostra – ligou-se a sítios inicialmente ocupados pelo zinco, evidenciando a maior estabilidade dos complexos envolvendo o cobre.

Em outro estudo descrito na literatura, Xue e colaboradores (1997) observaram que a especiação dos metais cobre e zinco nas águas dos Lagos Greifen e Sempach foi similar. O cobre mostrou-se mais fortemente complexado por ligantes orgânicos dissolvidos, em ambos os corpos aquáticos, enquanto o zinco esteve presente em maiores concentrações na forma livre e igualmente na forma de complexos fracos com a matéria orgânica dissolvida. As concentrações das espécies iônicas livres de ambos os metais diferem de várias ordens de magnitude, com razões  $[Zn^{2+}]:[Cu^{2+}] = 10^5-10^6$  no Lago Greifen e  $10^4-10^6$  no Lago Sempach. Jansen e colaboradores (1998) também avaliaram a especiação e a labilidade do zinco em águas naturais. Contudo, é importante ressaltar que a determinação da especiação dos metais, nestes casos, baseou-se em abordagens experimentais distintas, diferentemente deste trabalho. Através da voltametria, determinaram valores de  $K'$  na ordem de  $10^6-10^7$ .

A Figura 25 relaciona as concentrações dos metais cobre e zinco, originalmente complexados, com as concentrações totais de ambos na fração dissolvida.



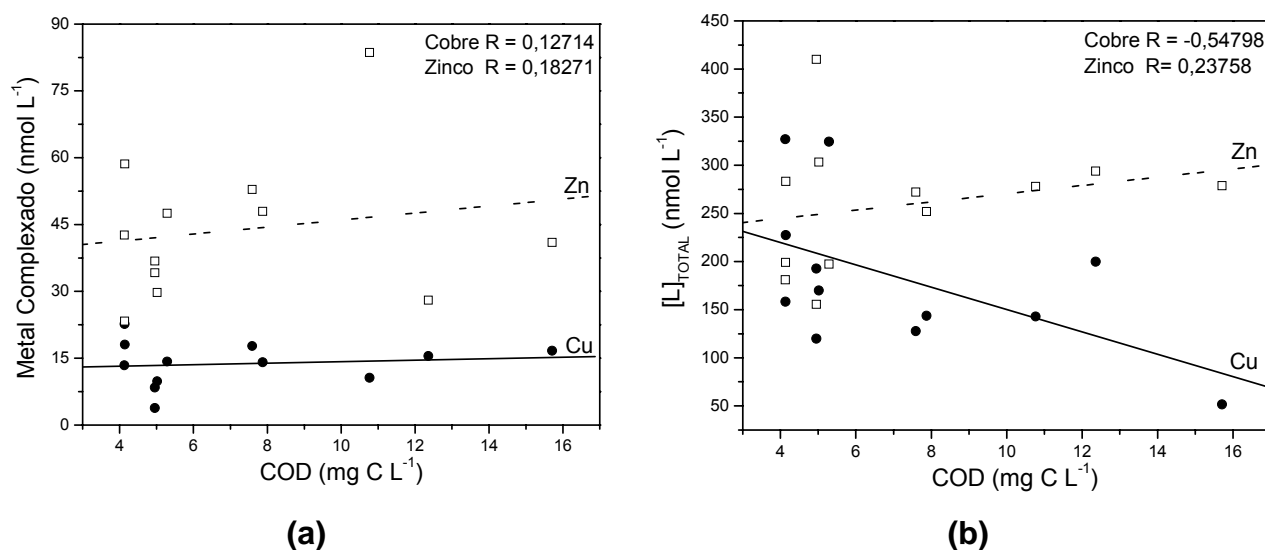
**Figura 25.** Concentrações de cobre (●) e zinco (□) complexados em função das suas respectivas concentrações na fração dissolvida.

A Figura 25 evidencia uma característica importante no que diz respeito à especiação dos metais nas águas do reservatório, pois na medida em que há um aumento da concentração do metal na fração dissolvida, observa-se a tendência de que os sítios de complexação sejam ocupados por estes metais. Estes resultados demonstram que o corpo aquático em estudo parece fornecer, de alguma maneira, um material capaz de complexar tanto o cobre quanto o zinco, regulando assim os teores dos metais presentes na forma lábil, ou seja, aquela reconhecidamente biodisponível e potencialmente tóxica.

Avaliar a capacidade de complexação de águas naturais frente a metais, como neste estudo da dinâmica do cobre e zinco nas águas do Reservatório do Iraí, refere-se à determinação da concentração de sítios capazes de complexar os referidos metais. Estes sítios encontram-se naturalmente disponíveis para interagir com o metal adicionado durante o procedimento de titulação, descrito no item 4.3 deste documento. Se uma amostra hipotética de água natural não contivesse metais, todos os sítios ligantes disponíveis a complexação seriam titulados. Quando nos referimos a uma amostra real, metais interagem naturalmente com os ligantes presentes no meio e, conseqüentemente, a avaliação da capacidade de

complexação nesta amostra forneceria apenas a concentração de sítios ligantes naturalmente não-ocupados.

Os resultados apresentados na Figura 26a descrevem a relação existente entre as concentrações dos metais cobre e zinco naturalmente complexados em função dos níveis de carbono orgânico dissolvido. Por outro lado, a Figura 26b refere-se apenas às concentrações de ligantes naturalmente não-ocupados pelos metais, em função dos teores de carbono orgânico determinados nas águas do reservatório.



**Figura 26. (a)** Concentrações dos metais cobre (●) e zinco (□) complexados ( $\text{CuL}$  e  $\text{ZnL}$ ) em função do teor de carbono orgânico dissolvido; **(b)** Variação da capacidade de complexação ( $[L]_{\text{TOTAL}}$ ) destes metais em função do carbono orgânico dissolvido para as águas do reservatório.

A tendência mostrada na Figura 26a indica valores relativamente constantes de metais complexados em função do aumento do carbono orgânico dissolvido. Assim, pode-se observar que a complexação do cobre não está associada aos sítios presentes na matéria orgânica. Embora o zinco apresente um comportamento semelhante, há uma leve tendência de aumento do zinco complexado com o aumento de carbono orgânico dissolvido, ou seja, os sítios

presentes na matéria orgânica têm uma maior afinidade pelo zinco e ao mesmo tempo parecem ser mais seletivos frente ao cobre.

Na Figura 26b observam-se comportamentos distintos com relação à influência dos teores de carbono orgânico dissolvido na capacidade de complexação para os metais, cobre e zinco. Para o zinco nota-se que o aumento da concentração de carbono orgânico dissolvido proporciona maiores valores de capacidades de complexação. Este comportamento pode indicar que os sítios de complexação associados à matéria orgânica dissolvida exercem um importante papel na complexação do zinco nestas águas. Para o cobre, foi apresentando um comportamento inverso, isto é, a matéria orgânica não oferece capacidade de complexação a este metal.

Segundo Stumm e Morgan (1996) substâncias orgânicas aportam em ambientes aquáticos a partir de inúmeras fontes o que pode provocar uma grande diversidade nas concentrações e nos tipos de matéria orgânica em corpos aquáticos receptores. É esperado, portanto, que diferentes tipos de matéria orgânica proporcionem diferentes concentrações de sítios ligantes capazes de complexar metais. De fato, isto é mostrado pela diferença de afinidade destes metais pela matéria orgânica.

#### **4.5 Avaliação do Comportamento e Dinâmica dos Metais Cobre e Zinco Empregando Análise Multivariada (PCA)**

Para avaliar a influência de parâmetros químicos e físicos no comportamento dos metais cobre e zinco nas águas do Reservatório do Iraí, além de análises univariadas, já descritas anteriormente, os dados obtidos durante o período anual de amostragem foram tratados de maneira multivariada através da análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*).

A análise de componentes principais consiste de um método que tem como finalidade básica a redução de dados a partir de combinações lineares sobre determinadas variáveis originais. Este tipo de análise pode resumir em poucas dimensões a maior parte da variabilidade de uma matriz de dados constituída por

um grande número de variáveis, sem entretanto comprometer ou alterar as informações importantes (Yabe e Oliveira, 1998), sendo possível, com esta ferramenta, identificar as possíveis influências dos parâmetros no comportamento da dinâmica dos metais cobre e zinco.

A análise de componentes principais baseia-se na decomposição de uma matriz de dados a partir de combinações lineares (correlação ou covariância) sobre as variáveis originais. Neste trabalho foi empregada a correlação da matriz para descrever a dispersão das variáveis originais e para extrair valores de autovalor (*eigenvalue*) e autovetor (*eigenvector*), conforme descrito na Equação 13.

$$\text{Cov}(X)p_i = \lambda_i p_i \quad (13)$$

Na Equação 13, X representa uma dada matriz de dados originais,  $\lambda_i$  corresponde aos autovalores (*eigenvalues*) relacionados aos valores de autovetores (*eigenvector*) ( $p_i$ ). Na PCA, os valores de  $p_i$ , denominados pesos, são obtidos pelos co-senos dos ângulos formados entre a componente principal e cada variável (Sodré *et al.*, 2005). Os pesos contêm informações relativas à inter-relação entre as variáveis originais. A forma na qual as amostras relacionam-se entre si é dada por vetores denominados escores, que correspondem às projeções das amostras na direção da componente principal.

Atualmente, vários trabalhos utilizam a análise multivariada (PCA) para elucidar processos químicos, físicos e biológicos que ocorrem em águas naturais.

Em estudo recente, Sodré e colaboradores (2005) avaliaram a influência de parâmetros químicos, físicos e meteorológicos no comportamento do cobre nas águas dos rios Iraí e Iguaçu, localizados na Região Metropolitana de Curitiba. Os dados obtidos durante o período de coleta foram tratados de maneira multivariada através da PCA. As duas primeiras componentes principais obtidas neste estudo, explicaram cerca de 62% da variância total dos dados, sendo que apenas a primeira componente foi responsável pela captura de cerca de 40% da variância.

Esta análise evidenciou que no período de maior pluviosidade, fontes de poluição difusa exerceram um papel fundamental para o aporte de cobre, enquanto que durante o período de menor pluviosidade, fontes pontuais mostraram-se mais importantes para o aporte deste metal, principalmente nas águas do Rio Iguaçu, devido ao descarte de esgotos.

Utilizando a análise de componentes principais (PCA), Mendiguchía e colaboradores (2004) avaliaram os efeitos causados por atividades antrópicas, na qualidade das águas Rio Guadalquivir. Este local constitui-se em fonte majoritária de água para toda a região sul da Espanha. Foram medidas diversas variáveis físico-químicas, tais como, pH, SST, nitrato, nitrito, amônio e fosfato. Além destes parâmetros, avaliaram também as concentrações de  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , nos vinte e seis locais de amostragens ao longo do rio. Esta análise permitiu a identificação de quatro zonas no Rio Guadalquivir, com diferentes qualidades de água. Através do estudo da PCA, as três primeiras componentes principais explicaram 79,1% da discrepância dos dados. A CP1 explicou 46,9% da discrepância, associada principalmente a nitrito, amônio e manganês. A CP2, que explicou 22,5% da discrepância, era correlacionada principalmente com sólidos suspensos e fosfato. Por sua vez, a CP3 que explicou 9,7% da discrepância, relacionada sobretudo ao nitrato e à concentração de cobre.

Antonietti e Sartore (1996) realizaram um estudo visando a otimização da escolha dos parâmetros empregados na avaliação da qualidade das águas naturais do Vale do Parma, na Itália. A utilização da PCA permitiu que houvesse uma redução de 13 para 4 parâmetros monitorados, capazes de caracterizar o ambiente. Informações obtidas após este estudo descrevem uma situação ambiental muito próxima com a análise realizada há vinte anos, sem o auxílio da PCA.

Silva e colaboradores (2005) realizaram um estudo sobre os impactos ambientais causados por atividades agrícolas e industriais ao longo da bacia do rio Mogi Guaçu. Neste trabalho foram determinadas as concentrações de ferro, cádmio, cobre, cromo, zinco, níquel, chumbo e manganês, em quinze estações de coleta de sedimentos e em dois períodos diferentes, chuvoso em março de 2001 e



seco em junho de 2001. Os métodos de reconhecimento de padrões PCA e HCA foram utilizados para agrupar as amostras coletadas em São Paulo e em Minas Gerais e desta forma obter informações relevantes sobre as possíveis fontes de contaminação do rio Mogi Guaçu de acordo com o período de coleta das amostras. Nas amostras de março de 2001, as duas primeiras componentes principais explicaram 81,19% da variância total, enquanto em junho de 2001, as duas primeiras componentes principais explicaram 80,08%. De uma maneira geral, a concentração dos metais estudados se apresenta em altos níveis em todas as estações de coleta e este fato caracteriza um ambiente com alto grau de contaminação causada, principalmente, por atividades antropogênicas.

No presente trabalho, a análise de componentes principais foi utilizada para avaliar variações sazonais nos níveis de cobre e zinco e, ao mesmo tempo, identificar as influências dos parâmetros medidos, na especiação, comportamento e dinâmica destes metais. Os parâmetros utilizados para a análise de componentes principais são mostrados na Tabela 8. A tabela completa contendo todos os dados utilizados na análise de componentes principais é mostrada no Anexo.

**Tabela 8.** Parâmetros utilizados na análise de componentes principais.

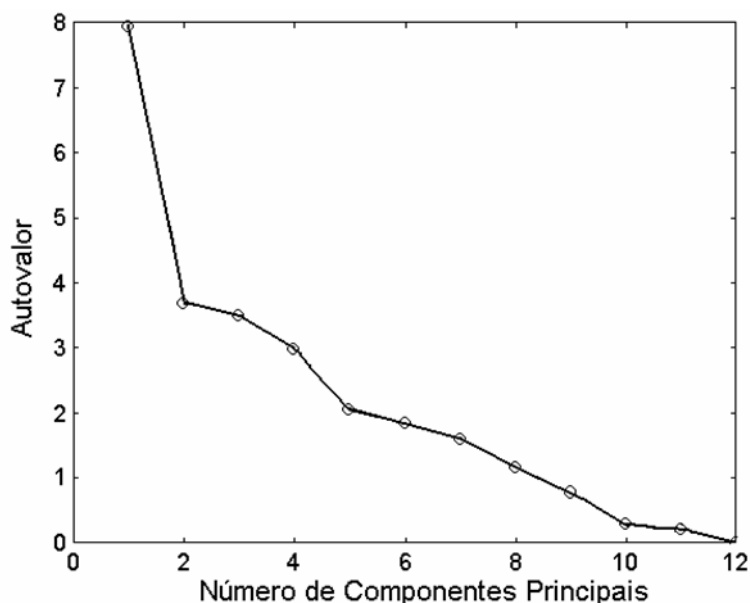
Parâmetros (Variáveis)	Abreviatura	Unidade	Valor na PCA
Cloreto	Cl	mg L <sup>-1</sup>	1
Temperatura Ambiente	Tamb	°C	2
Temperatura da Água	Tag	°C	3
Clorofila-a	-	µg L <sup>-1</sup>	4
Nível de água do Reservatório	-	m	5
pH	-	-	6
Oxigênio Dissolvido	OD	mg L <sup>-1</sup>	7
Carbono Orgânico Dissolvido	COD	mg L <sup>-1</sup>	8
Sólidos Suspensos Totais	SST	mg L <sup>-1</sup>	9
Alcalinidade	Alc	mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup>	10
Cobre Total Recuperável	CuTR	nmol L <sup>-1</sup>	11
Cobre Total Dissolvido	CuTD	nmol L <sup>-1</sup>	12
Zinco Total Recuperável	ZnTR	nmol L <sup>-1</sup>	13
Zinco Total Dissolvido	ZnTD	nmol L <sup>-1</sup>	14
Cobre Complexado	CuL	nmol L <sup>-1</sup>	15
Zinco Complexado	ZnL	nmol L <sup>-1</sup>	16
Cobre Lábil	Cu <sub>lab</sub>	nmol L <sup>-1</sup>	17
Zinco Lábil	Zn <sub>lab</sub>	nmol L <sup>-1</sup>	18
Cobre Livre	Cu <sub>liv</sub>	nmol L <sup>-1</sup>	19
Zinco Livre	Zn <sub>liv</sub>	nmol L <sup>-1</sup>	20
Concentração de sítios disponíveis (Cobre)	[L] <sub>TOTAL</sub> Cu	nmol L <sup>-1</sup>	21
Concentração de sítios disponíveis (Zinco)	[L] <sub>TOTAL</sub> Zn	nmol L <sup>-1</sup>	22
Log K' Cobre	Log K' Cu	-	23
Log K' Zinco	Log K' Zn	-	24
Log K <sub>D</sub> Cobre	Log K <sub>D</sub> Cu	-	25
Log K <sub>D</sub> Zinco	Log K <sub>D</sub> Zn	-	26

A partir dos parâmetros mostrados na Tabela 8, foi construída uma matriz de dados de dimensão 12X26, que corresponde às doze amostras coletadas nas águas do Reservatório do Iraí, durante o período anual, e aos vinte e seis parâmetros e seus respectivos valores. Entretanto, um fator importante que deve ser levado em consideração é a condição para a realização da análise de componentes principais. Para estudos envolvendo análise multivariada a

existência de poucas amostras e uma grande quantidade de parâmetros pode não oferecer as condições ideais, pois isso restringe a avaliação das correlações entre amostras e variáveis.

Para a realização da PCA, os dados originais foram autoescalados e utilizados para gerar o modelo de regressão multivariada.

Na Figura 27 a seguir, é possível observar os autovalores, ou seja, os pesos estabelecidos para cada uma das doze componentes principais.



**Figura 27.** Gráfico de autovalores para cada componente principal e variância explicada.

Na Figura 27, o autovalor correspondente a cada componente principal é um parâmetro que indica o peso que cada variável original teve na elaboração da componente principal (CP), demonstrando que a componente principal não apresenta qualquer significado físico-químico. Trata-se de uma entidade matemática, elaborada a partir das variáveis originais visando, apenas, representar o máximo de variância possível.

Por definição, a primeira CP resulta da melhor combinação linear possível, sendo responsável pela maior variância explicada. Pelo princípio de ortogonalidade, a segunda CP se apresenta complementar, representando a variância não explicada pela primeira CP, e assim sucessivamente para as

componentes restantes. Em geral, podem ser calculadas tantas componentes principais (CP) quantas sejam as variáveis originais. Entretanto, se o número de novas componentes for reduzido, a interpretação dos dados é favorecida.

A Tabela 9 mostra os autovalores, ou seja, a porcentagem de variância capturada para cada uma das doze componentes principais fornecidas e a variância total capturada pela análise de componentes principais.

**Tabela 9.** Variância capturada, em termos percentuais, para cada componente principal durante a análise multivariada.

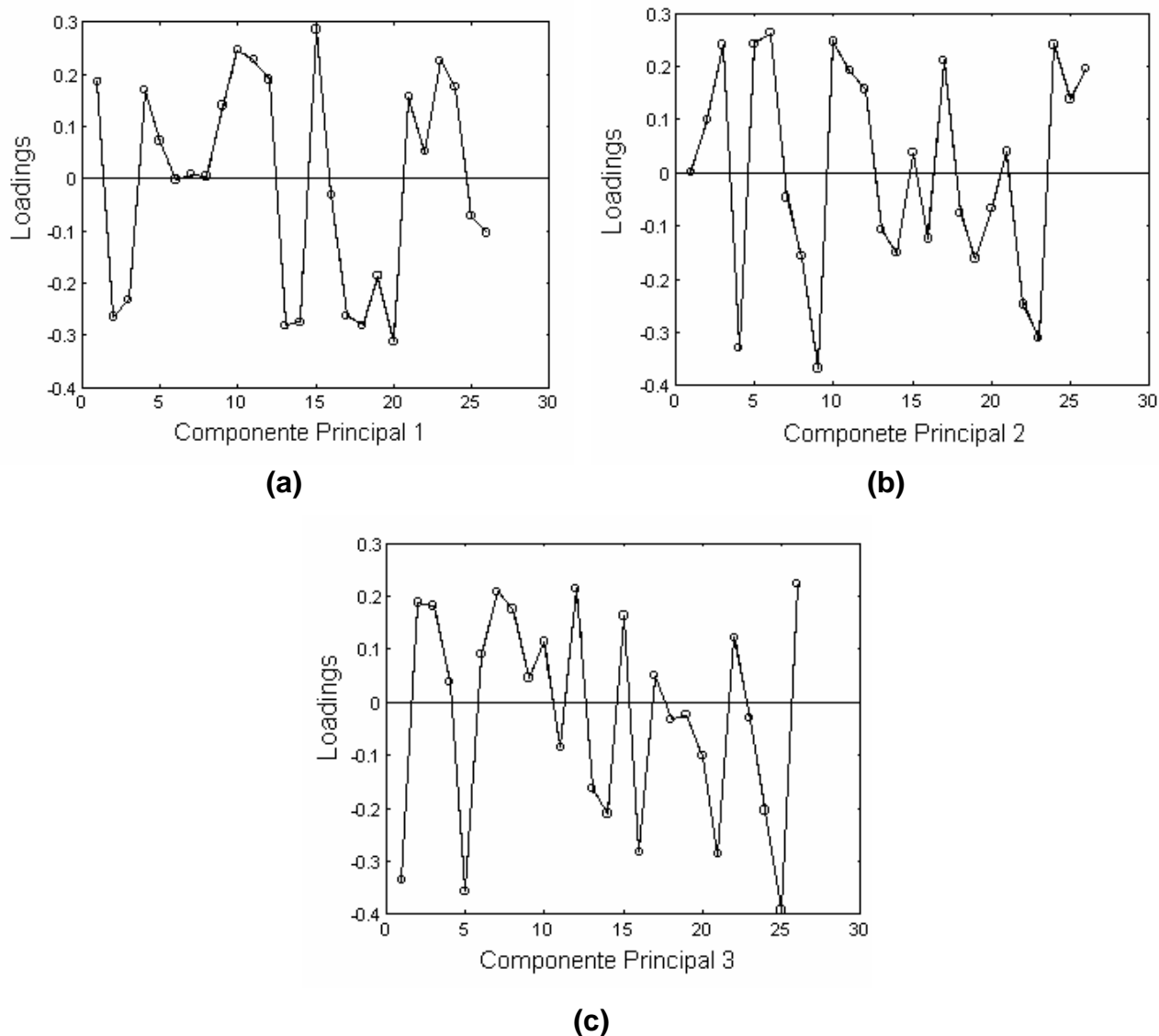
<b>Número da Componente Principal (CP)</b>	<b>Autovalores para a matriz Cov(X)</b>	<b>Variância capturada por cada CP (%)</b>	<b>Variância total (%)</b>
1	7,94	30,53	30,53
2	3,69	14,20	44,73
3	3,50	13,47	58,20
4	2,98	11,46	69,65
5	2,03	7,81	77,46
6	1,83	7,05	84,51
7	1,60	6,17	90,68
8	1,14	4,39	95,07
9	0,785	3,02	98,10
10	0,284	1,09	99,19
11	0,211	0,81	100,00
12	$7,15 \cdot 10^{-17}$	0,00	100,00

Como pode ser observado na Tabela 9, as sete primeiras componentes principais explicaram 90,68% da variância total dos dados, sendo que as três primeiras foram responsáveis pela captura de aproximadamente 60% das componentes principais.

No presente estudo foi utilizada a correlação com as sete primeiras componentes principais, mas para a avaliação dos resultados obtidos utilizou-se as três primeiras CP apenas. O critério adotado para esta escolha baseou-se na

detecção da variação dos principais parâmetros, que nesta análise ficou concentrada nas três primeiras componentes principais.

Para avaliar como os parâmetros correlacionam-se com as três primeiras componentes principais, a Figura 28, a seguir, apresenta os loadings obtidos para (a) CP1, (b) CP2, e (c) CP3, respectivamente, em função dos valores dos pesos.



**Figura 28.** Loadings entre as componentes principais (a) 1, (b) 2 e (c) 3 e os valores dos pesos.

Comparando-se os pesos das CP 1, 2 e 3, mostrados na Figura 28, é possível verificar também que cada uma delas foi elaborada de maneira diferente, dando-se pesos diferentes para cada variável original processada.

A partir da Figura 28a pode-se observar que as variáveis cloreto, temperatura ambiente, clorofila-a, alcalinidade, cobre e zinco total recuperável, cobre complexado, zinco lábil e zinco livre fornecem maior peso para a primeira componente principal.

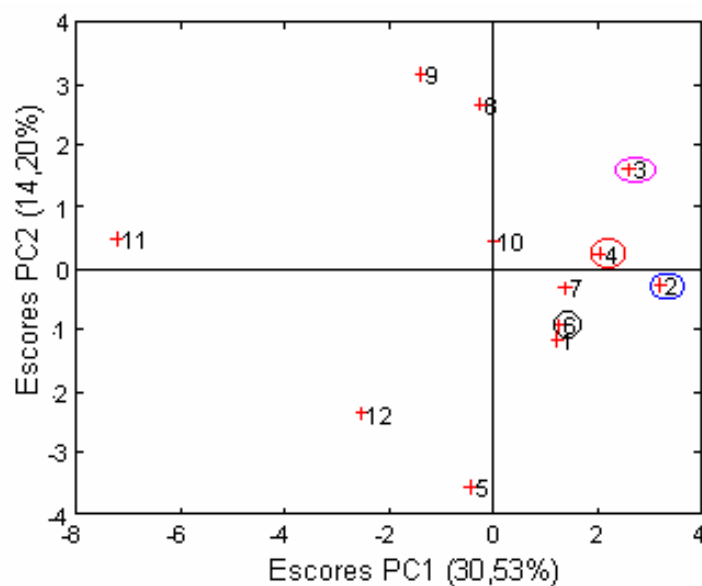
A segunda componente principal, mostrada na Figura 28b, correlaciona principalmente parâmetros analíticos; temperatura da água, clorofila-a, nível de água do reservatório, pH, SST e alcalinidade. Para esta componente principal nota-se também um elevado coeficiente de correlação para o  $\text{Log } K' \text{ Cu}$  e  $\text{Log } K' \text{ Zn}$ .

Uma análise similar da Figura 28c demonstra que a terceira componente principal correlaciona-se com os parâmetros que, em conjunto, determinam o nível de impacto ambiental associado ao corpo aquático natural, ou seja, cloreto, OD, COD. Além destes, temperatura ambiente e da água, nível de água do reservatório, cobre total dissolvido,  $\text{Log } K_D \text{ Cu}$  e  $\text{Log } K_D \text{ Zn}$ .

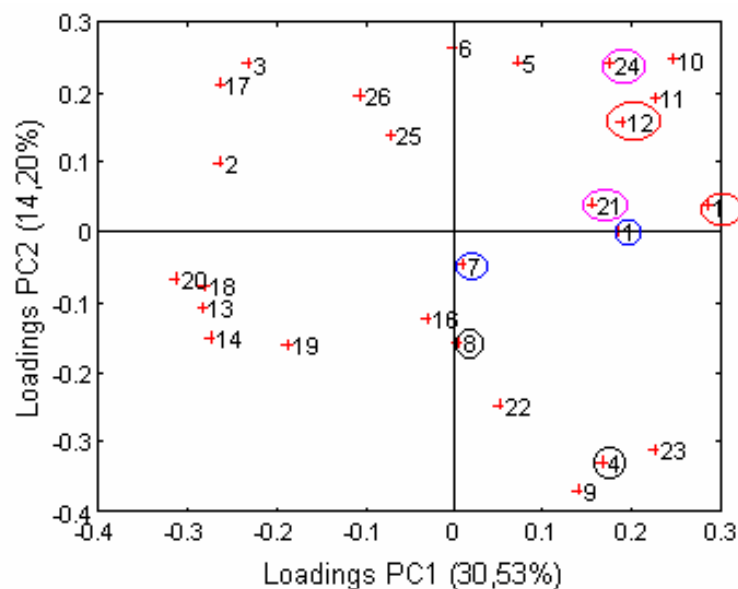
Na Figura 29, a seguir, estão apresentados os gráficos de escores de cada uma das doze amostras e respectivos pesos dos vinte e seis parâmetros analisados na superfície descrita pelas componentes 1 e 2. Levando em consideração que estas CP representam o conjunto de parâmetros monitorados, qualquer semelhança entre os valores de escores indicará afinidade em relação às variáveis originais. Para identificar as variáveis que tornam possível a discriminação das amostras, há necessidade de se recorrer ao gráfico de pesos.

O gráfico de escores para as duas primeiras componentes principais é mostrado na Figura 29a. Neste gráfico é possível observar a influência dos parâmetros sobre a distribuição espacial das amostras. A influência dos parâmetros foi obtida através do gráfico de pesos, mostrado na Figura 29b, e foi correlacionada ao gráfico de escores através da distribuição dos parâmetros (variáveis) nos quadrantes formados pela intersecção das componentes principais 1 e 2.

As amostras 2 e 6, localizadas no quadrante inferior direito, apresentam relações claras e objetivas com os parâmetros correspondentes ao mesmo quadrante. Observações similares podem ser feitas com as amostras 3 e 4, localizadas no quadrante superior direito, formando agrupamentos que podem ser diferenciados da amostra restante.



(a)



(b)

**Figura 29.** Gráficos de (a) escores e (b) pesos para as componentes principais 1 e 2 geradas através da análise multivariada dos dados.

A PCA é uma ferramenta que auxilia na interpretação dos dados. Somente é possível tecer considerações a respeito da dinâmica e comportamento da



especiação dos metais (cobre e zinco) e sua correlação com as variáveis, devido o conhecimento prévio da especiação de metais e sobre explicações de natureza ecotoxicológica.

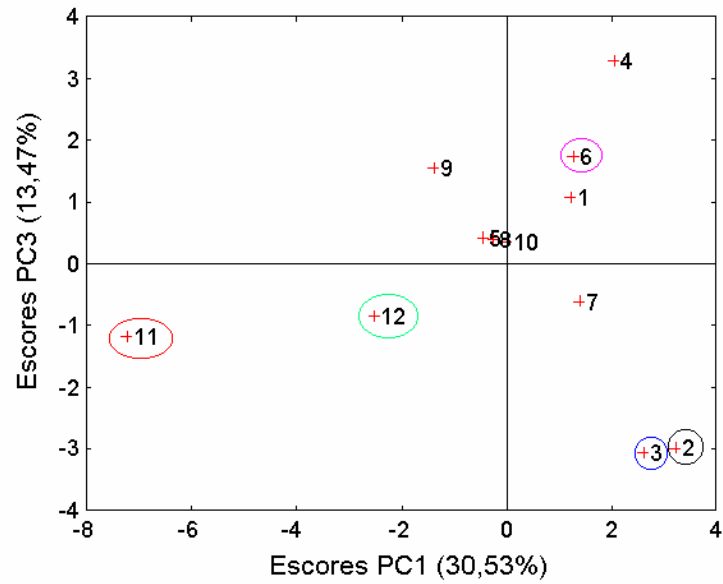
O gráfico de escores descrito na Figura 29, onde as amostras 3 e 4 estão localizadas no quadrante superior direito, sugere, a partir do gráfico de pesos, relações com as variáveis 21 e 24 e 12 e 15, as quais correspondem às medidas obtidas para as variáveis  $[L]_{TOTAL}Cu$ ,  $\log K' Zn$ ,  $CuTD$ ,  $CuL$ , respectivamente. Tal relação está associada aos valores máximos determinados para estas variáveis. Como exemplo, pode-se citar a amostra 4, quando relacionada aos maiores valores de  $CuTD$  e  $CuL$ , evidencia que o sistema complexa o cobre, favorecendo uma menor biodisponibilidade deste metal nas águas do reservatório. De fato, isto foi observado no estudo da avaliação da capacidade de complexação do cobre nas águas do reservatório, como mencionado anteriormente. Apesar do cobre apresentar em média, os maiores valores de  $\log K'$  e o zinco, as maiores concentrações de  $[L]_{TOTAL}$ , a análise similar observada neste quadrante sugere que a amostra 3 é influenciada pelos parâmetros 21 e 24, que correspondem aos maiores níveis de  $[L]_{TOTAL}Cu$  e  $\log K' Zn$ . Este resultado, embora seja inverso ao observado na maior parte das vezes, merece ser destacado. De alguma forma, parece haver por parte do sistema, no caso os excretados das microalgas do reservatório, uma maneira de exercer um controle sobre a biodisponibilidade dos metais, seja através da força de ligação do metalo-complexo, ou ainda pela oferta de uma maior quantidade de sítios de complexação.

Avaliando o quadrante inferior direito, pode-se observar a relação direta da amostra 6 com os parâmetros 4 e 8, isto é, clorofila-a e carbono orgânico dissolvido, respectivamente. Esta avaliação sugere a existência de uma relação entre estes dois parâmetros. Tal relação parece indicar que no caso desta amostra, a matéria orgânica presente no lago está relacionada a uma componente biótica endógena, na medida em que está vinculada a um parâmetro indicativo da produção primária da comunidade fitoplanctônica e, conseqüentemente, à presença de excretados das microalgas.

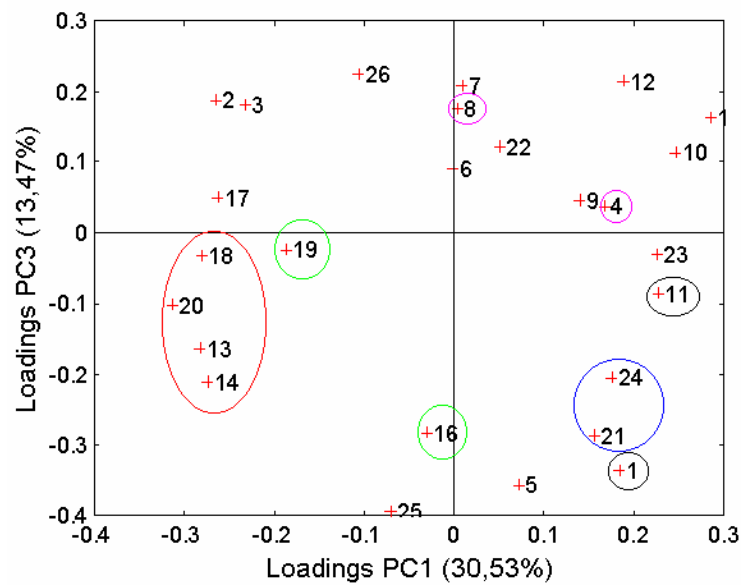
O mesmo procedimento foi adotado para a amostra 2, verificando que esta amostra encontra-se relacionada indiretamente com os parâmetros 1 e 7. Esta amostra evidencia o maior valor de cloreto e o menor valor de OD. Tal informação confirma o indício de que a presença de cloreto, que é um indicativo de descarte de esgoto, propicia menores valores de oxigênio dissolvido.

Na Figura 30 a seguir, estão apresentados os gráficos de escores e pesos para a primeira e terceira componentes principais. Observando estes gráficos é possível avaliar a influência das variáveis sobre a distribuição espacial da amostra na superfície descrita pelas componentes 1 e 3.

A amostra 6, localizada no quadrante superior direito, apresenta fortes relações com as variáveis 4 e 8, correspondentes ao mesmo quadrante. Uma análise semelhante foi feita com as amostras 2, 3, 11 e 12, localizadas nos quadrantes inferiores. Estas correlações formam agrupamentos que podem ser diferenciados das amostras restantes.



(a)



(b)

**Figura 30.** Gráficos de (a) escores e (b) pesos para as componentes principais 1 e 3 geradas através da análise multivariada dos dados.

Na Figura 30a, o gráfico de escores indica a relação da amostra 6, que está localizada no quadrante superior direito, com o gráfico de pesos, Figura 30b. Esta análise identifica que os parâmetros 4 e 8 mais uma vez apresentam uma relação

direta entre clorofila-a e carbono orgânico dissolvido, fato já observado na análise da CP1 vs. CP2. Esta distribuição espacial confirma a hipótese de que os parâmetros clorofila-a, COD e SST apresentam uma relação direta, isto é, a matéria orgânica e os sólidos presentes nas águas do reservatório são de origem biótica endógena.

No quadrante inferior esquerdo observa-se uma relação clara da amostra 11 com os maiores valores dos parâmetros 13, 14, 18 e 20, que correspondem a ZnTR, ZnTD, ZnLável e Znlivre, respectivamente. A correlação existente entre estes níveis mostra que o sistema responde de maneira proporcional ao aumento da concentração do metal, pois com o aumento da fração total recuperável do zinco, todas as outras frações aumentam da mesma maneira e, com isso, há um favorecimento no aumento da biodisponibilidade do metal para o ambiente aquático. Ainda neste mesmo quadrante, a amostra 12 está relacionada com os parâmetros 16 e 19, ZnL e Culivre, mostrando desta forma um indício de que existe competição por sítios ocupados nestas águas, pois com o aumento do ZnL, há uma maior concentração do Culivre. Ou seja, quando o sistema favorece a complexação do zinco com ligantes, há um desfavorecimento na complexação com cobre, supostamente liberando sítios para que ocorra a complexação com o zinco.

A amostra 2, localizada no quadrante inferior direito, apresenta uma relação direta com os parâmetros 1 e 11, cloreto e CuTR. Esta correlação traz evidências de que existe uma relação da origem do aporte de cobre nas águas do reservatório, oriundo do descarte de esgotos, explicada pelos níveis ligeiramente mais elevados de cloreto.

Entretanto, inter-relações entre outras amostras não se mostraram evidentes, impedindo qualquer correlação com parâmetros específicos do mesmo quadrante.

Os resultados obtidos pela aplicação da PCA revelam que grande parte da capacidade discriminatória do conjunto de dados é exercida por apenas 15 variáveis. O presente trabalho tem como um de seus objetivos avaliar o comportamento e a dinâmica da especiação dos metais e a interação destas

variáveis com os parâmetros. Sendo assim, mesmo que a partir da avaliação da PCA algumas variáveis relacionadas à especiação possam ser ignoradas, todos os parâmetros envolvidos e análises realizadas durante o ciclo anual de amostragem são importantes e insubstituíveis para que possa existir um estudo completo, capaz de avaliar a dinâmica e o comportamento destes metais nas águas do Reservatório do Iraí. Desta forma, a avaliação da PCA sugeriu conclusões que confirmaram hipóteses anteriormente levantadas, como também contribuiu fornecendo correlações importantes para a avaliação geral dos resultados obtidos neste estudo.

As conclusões obtidas através da PCA confirmaram diante de estudos e interpretações já realizadas anteriormente, algumas suposições relacionadas ao comportamento e a dinâmica dos metais cobre e zinco, assim como a interação com os parâmetros analíticos. Deve ser ressaltado, entretanto, que isto só foi possível devido o conhecimento prévio sobre a química aquática e as possíveis avaliações de natureza ecotoxicológica. Ou seja, a PCA é uma ferramenta matemática que auxilia na contribuição da interpretação dos dados, mas isto só é possível através do conhecimento dos fatores que contribuem para as correlações observadas e suas conseqüências para o ambiente aquático sob estudo.

Apesar do pequeno número de amostras, apenas doze, e ao grande número de variáveis, vinte e seis, que restringe a avaliação nas correlações entre amostras e variáveis, este estudo demonstrou que há múltiplas possibilidades de se avaliar o comportamento dos metais. As possibilidades que não foram perceptíveis para a PCA, não apontaram tendências claras nos comportamentos distintos. Como observado nas informações obtidas anteriormente, a Análise de Componentes Principais sugere algumas tendências que relacionam os resultados das análises realizadas de uma maneira bastante clara, objetiva e satisfatória.

#### 4.6 Competição entre os Metais Cobre e Zinco por Sítios de Ligação Disponíveis nas Águas do Reservatório

Para avaliar a competição entre os metais cobre e zinco por sítios de ligação presentes nas águas do Reservatório do Iraí, realizou-se a determinação de todos os parâmetros analíticos comumente obtidos nas amostras mensais, tais como pH, nível do reservatório, níveis de oxigênio dissolvido, temperatura ambiente e da água, alcalinidade total, COD, SST, cloreto dissolvido e clorofila-a. Além destes, realizou-se também a especiação dos metais, obtendo os valores de concentração para o metal total dissolvido, metal total recuperável e determinou-se capacidade de complexação da amostra, obtendo os valores de concentração para o metal lábil ( $[M']$ ), metal complexado ( $[ML]$ ), constante de estabilidade condicional ( $K'_{ML}$ ) e concentração de sítios disponíveis ( $[L]_{TOTAL}$ ).

A seguir, na Tabela 10, estão apresentados os valores obtidos para uma das capacidades de complexação realizadas.

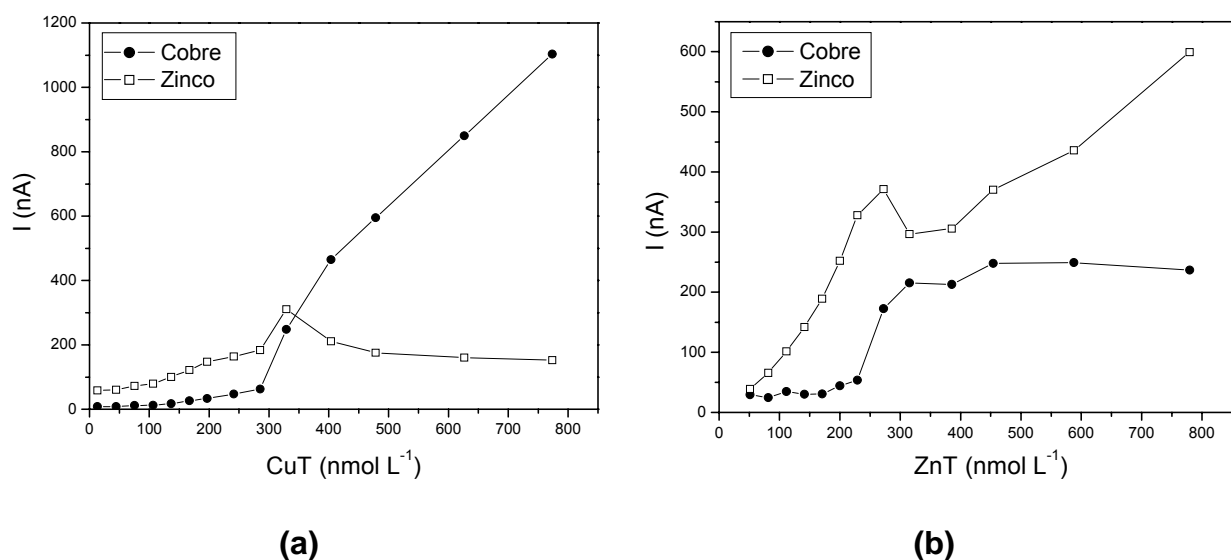
**Tabela 10.** Valores de cobre e zinco total recuperável e dissolvido e parâmetros de complexação da amostra de água do Reservatório do Iraí.

Parâmetros	Unidade	Cobre	Zinco
Metal Total Recuperável (MTR)		14,32	72,68
Metal Total Dissolvido (MTD)		13,37	51,15
Metal Lábil ( $M_{lab}$ )	nmol L <sup>-1</sup>	2,70	14,13
Metal Livre ( $M_{liv}$ )		1,89	13,50
Metal Complexado (ML)		10,67	37,02
$[L]_{TOTAL}$		151,40	160,41
Log $K'$	-	7,41	7,35

Para determinar a capacidade de complexação dos metais, as titulações da amostra de água do Reservatório do Iraí foram realizadas em duplicata, apresentando valores médios de Log  $K' = 7,64$  e  $[L]_{TOTAL} = 163,2$  nmol L<sup>-1</sup> para o cobre e Log  $K' = 7,27$  e  $[L]_{TOTAL} = 192,7$  nmol L<sup>-1</sup> para o zinco. Os valores apresentados na Tabela 10, mais especificamente os valores de  $[L]_{TOTAL}$  para o cobre e zinco, foram utilizados para determinar as concentrações correspondentes

dos metais para a fortificação da amostra antes da realização da titulação. A fortificação da amostra com cobre, por exemplo, foi realizada no dia anterior à titulação com zinco. Após a adição, a amostra permaneceu em equilíbrio por aproximadamente 15 horas. No dia seguinte à adição, titulou-se a amostra com zinco, para avaliar a competição deste metal pelos sítios já ocupados pelo cobre. Procedimento semelhante foi realizado para zinco, ou seja, a amostra foi inicialmente fortificada com este metal, foi deixada em repouso e finalmente titulada com cobre.

A Figura 31a mostra o que ocorre com as correntes de pico referentes aos metais cobre e zinco, quando a amostra foi titulada com cobre, após ter sido fortificada com cerca de  $164 \text{ nmol L}^{-1}$  de zinco e a curva de titulação com cobre. A Figura 31b apresenta o comportamento das correntes de pico dos dois metais, porém em situação inversa, ou seja, a titulação com zinco após fortificação da amostra com  $156,58 \text{ nmol L}^{-1}$  de cobre.



**Figura 31.** Voltamogramas referentes às competições de cobre e zinco na amostra de água do Reservatório do Iraí. **(a)** Adição de  $\text{Zn}^{2+}$  e titulação com  $\text{Cu}^{2+}$  ( $500 \mu\text{g L}^{-1}$ ); **(b)** Adição de  $\text{Cu}^{2+}$  e titulação com  $\text{Zn}^{2+}$  ( $500 \mu\text{g L}^{-1}$ ).  $I$ :  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em  $\text{KNO}_3$ ;  $E_{\text{dep}}$ :  $-1,2 \text{ V}$  (vs  $\text{Ag/AgCl}$ );  $\text{Cu}^{2+}$ :  $E_i$ :  $-0,6 \text{ V}$  e  $E_f$ :  $0,15 \text{ V}$ ;  $\text{Zn}^{2+}$ :  $E_i$ :  $-1,2 \text{ V}$  e  $E_f$ :  $-0,6 \text{ V}$ ;  $t_{\text{dep}}$ :  $600 \text{ s}$ ; amplitude do pulso:  $50 \text{ mV}$ ; velocidade de varredura:  $8 \text{ mV s}^{-1}$ ; purga entre as adições:  $180 \text{ seg.}$ ; tempo de equilíbrio:  $20 \text{ min.}$

Os dados contidos na Figura 31a demonstram que à medida que a amostra é titulada com cobre, ocorre um aumento mais pronunciado da corrente de pico referente ao zinco, o que significa, muito provavelmente, que o cobre adicionado compete com o zinco pelos sítios de ligação presentes na amostra. Assim sendo, após cada adição de cobre, observa-se um aumento na concentração de zinco lábil, o que significa que este metal está sendo substituído pelo cobre nos ligantes presentes. A partir de um determinado momento, entretanto, observa-se que um aumento adicional na concentração de cobre, acima de  $285 \text{ nmol L}^{-1}$ , não resulta em variação na concentração do zinco. Ao contrário, a concentração de zinco lábil permanece constante, enquanto a de cobre lábil, por sua vez, aumenta quase que linearmente. Esta mudança de comportamento representa a situação onde a capacidade de complexação do sistema, frente ao cobre, foi esgotada. Portanto, é possível concluir que nem todos os sítios de ligação inicialmente ocupados pelo zinco são substituídos pelo cobre. Isto ocorre apenas parcialmente.

O comportamento do sistema quando a amostra foi fortificada com cobre e titulada com zinco foi bastante diferente. De acordo com o mostrado na Figura 31b, no início da titulação não há variação na corrente de pico referente ao cobre, enquanto aquela referente ao zinco aumenta sensivelmente. Estes resultados demonstram que o zinco adicionado através da titulação não compete com o cobre pelos sítios de ligação presentes no sistema. De fato, como evidenciaram os dados obtidos durante todo o período de um ano de coletas, a constante de estabilidade condicional média para os complexos envolvendo cobre foi sempre superior aquela envolvendo zinco. Contudo, este comportamento não se mantém inalterado quando as quantidades de zinco adicionadas são mais elevadas. Quando a concentração de zinco adicionada durante a titulação aproxima-se de cerca de  $250 \text{ nmol L}^{-1}$  o comportamento dos metais sofre uma drástica modificação. A partir deste ponto, nota-se claramente que as correntes de pico referentes ao cobre aumentam, enquanto que aquelas relativas ao zinco tendem a exibir um comportamento constante, evidenciando um aumento nas concentrações de cobre lábil. Este aumento representa, certamente, o



deslocamento do cobre de determinados sítios de complexação, que a partir de então devem passar a ser ocupados pelo zinco.

Quando a concentração de zinco adicionada ultrapassa os 300 nmol L<sup>-1</sup> o sistema volta a apresentar o mesmo comportamento descrito para a primeira porção da curva de titulação.

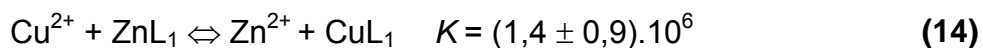
Os resultados obtidos neste experimento permitem supor que a substituição do cobre pelo zinco em alguns sítios de complexação pode ser decorrente de dois fatores: (i) efeitos cinéticos; (ii) efeitos da concentração adicionada. No primeiro caso, é possível sugerir que a substituição do cobre pelo zinco só ocorre depois de um longo tempo de equilíbrio, isto é, um intervalo de tempo superior aos 20 min decorridos após cada adição do titulante, previamente à realização da medida voltamétrica. A segunda possibilidade pode estar relacionada ao efeito do aumento significativo na concentração do zinco, ocorrido durante a titulação. Pode-se ainda supor que o comportamento descrito na Figura 31b seja resultante de um somatório dos dois fatores descritos anteriormente. De qualquer maneira, os resultados obtidos neste trabalho permitem supor que o material complexante presente nas águas do Reservatório do Iraí tenham certa especificidade quanto a sua capacidade de complexar metais. Uma vez que as concentrações de zinco encontradas nas águas do reservatório foram sempre superiores às de cobre, é possível que parte do material excretado pelas microalgas tenham sítios que sejam capazes, preferencialmente, de complexar este metal. Isto corresponderia ao desenvolvimento de uma capacidade de pelo menos tentar regular a presença de concentrações mais elevadas de zinco na forma biodisponível.

Um comportamento relativamente semelhante foi observado em estudos realizados por Xue e Sigg (1994) e Xue *et al.* (1995), que observaram que o cobre era mais fortemente complexado por sítios de ligação presentes em amostras de águas de lagos suíços, ou seja pela matéria orgânica, quando comparado ao zinco.

Xue e colaboradores (1995) avaliaram a especiação dos metais cobre e zinco no lago eutrofizado Greifen e observaram comportamentos distintos para os metais. O cobre é fortemente complexado por ligantes orgânicos, ao passo que a

fração majoritária do zinco está presente como zinco livre e complexos orgânicos fracos. Esta proporção pode refletir diferentes tendências destes metais pela complexação com ligantes orgânicos fortes. Com o objetivo de investigar a competição entre cobre e zinco por ligantes fortes naturais, realizou-se a quantificação e a seletividade destes ligantes, promovendo uma comparação entre eles, desta forma, determinando a constante de troca pelos ligantes presentes na amostra.

No estudo de Xue e colaboradores (1995) as titulações da água do lago foram interpretadas considerando 2 modelos de ligantes ( $L_1$  forte e  $L_2$  fraco). O modelo matemático, FITEQL, utilizado por estes autores, estimou as constantes de estabilidade condicionais ( $K'_1$  e  $K'_2$ ) e as concentrações de ligantes ( $L_1$  e  $L_2$ ). Os autores observaram que a substituição do zinco por complexos eletroquimicamente inertes, após a adição de cobre, sugere uma direta competição do cobre com o zinco por ligantes em toda amostra de água estudada. A partir da seletividade dos ligantes naturais pelo cobre numa proporção maior que para o zinco, foi possível avaliar a constante condicional da reação, como mostra a Equação 14. Os autores sugerem ainda que esta alta seletividade dos ligantes frente ao cobre é provavelmente de origem biológica.



A constante de troca foi obtida através dos balanços de massa descrito nas equações que seguem.

Para avaliar a competição entre o cobre e o zinco por ligantes fortes, considerou-se uma estequiometria de complexação 1:1 para ambos os metais. O balanço de massa pode ser escrito para cobre dissolvido ( $[\text{CuTD}]$ ) e zinco dissolvido ( $[\text{ZnTD}]$ ), com ligantes fortes  $L_1$ , e ligantes fracos  $L_2$ .

$$[\text{CuTD}] = [\text{CuL}_1] + [\text{CuL}_2] + \Sigma[\text{Cu}_{\text{inorg}}] + [\text{Cu}^{2+}] \quad (15)$$

$$[\text{ZnTD}] = [\text{ZnL}_1] + [\text{ZnL}_2] + \Sigma[\text{Zn}_{\text{inorg}}] + [\text{Zn}^{2+}] \quad (16)$$

Na equação 15 e 16,  $[\text{Cu}_{\text{inorg}}]$  e  $[\text{Zn}_{\text{inorg}}]$  referem-se aos complexos inorgânicos de cobre e zinco. É importante mencionar que, no trabalho de Xue e colaboradores (1995), a competição entre o cobre e o zinco por  $\text{L}_2$  não foi estudada em detalhes, pois estes autores consideraram que os ligantes fracos estão provavelmente presentes em excesso em relação aos metais na água do lago, então os efeitos de competição não são importantes para  $\text{L}_2$  neste níveis ambientais. Considerando que  $[\text{ZnL}_1]$  é eletroquimicamente inerte, a concentração de zinco lábil pode ser descrita da seguinte maneira:

$$[\text{Zn}]_{\text{lab}} = [\text{ZnL}_2] + \Sigma[\text{Zn}_{\text{inorg}}] + [\text{Zn}^{2+}] \quad (17)$$

Desta forma, o balanço de massa para  $\text{L}_1$  é representado por:

$$[\text{L}_1]_{\text{T}} = [\text{CuL}_1] + [\text{ZnL}_1] + [\text{L}_1] \quad (18)$$

A constante de estabilidade para cobre com  $\text{L}_1$  é mostrada na equação a seguir:

$$\text{Cu}^{2+} + \text{L}_1 \rightleftharpoons \text{CuL}_1 \quad K_{1\text{Cu}} = \frac{[\text{CuL}_1]}{[\text{L}_1][\text{Cu}^{2+}]} \quad (19)$$

A constante de estabilidade para zinco com  $\text{L}_1$  é dada a partir da seguinte equação:

$$\text{Zn}^{2+} + \text{L}_1 \rightleftharpoons \text{ZnL}_1 \quad K_{1\text{Zn}} = \frac{[\text{ZnL}_1]}{[\text{L}_1][\text{Zn}^{2+}]} \quad (20)$$

Sendo assim, a constante de troca é definida a partir da reação que segue.



E a constante de troca torna-se:

$$K_{\text{ex}} = \frac{[\text{CuL}_1][\text{Zn}^{2+}]}{[\text{ZnL}_1][\text{Cu}^{2+}]} = \frac{K_{1\text{Cu}}}{K_{1\text{Zn}}} \quad (22)$$

Durante a titulação da água do lago com cobre, observou-se que o cobre substitui o zinco nos complexos com  $\text{L}_1$ . Sendo assim, o balanço de massa pode ser escrito conforme a equação que segue, onde  $[\text{ZnL}_1]_0$  e  $[\text{CuL}_1]_0$  são as concentrações de zinco e cobre ligados inicialmente a  $\text{L}_1$  na amostra de água e  $\Delta[\text{Zn}]_{\text{lab}}$  corresponde ao aumento na concentração de zinco lábil devido a adição de cobre:

$$[\text{ZnL}_1] = [\text{Zn}]_{\text{T}} - [\text{Zn}]_{\text{lab}} = [\text{ZnL}_1]_0 - \Delta[\text{Zn}]_{\text{lab}} \quad (23)$$

$$[\text{CuL}_1] = [\text{CuL}_1]_0 + \Delta[\text{Zn}]_{\text{lab}} \quad (24)$$

Estas equações são válidas para o aumento de  $[\text{CuL}_1]$ , que é caracterizado pela diminuição de  $[\text{ZnL}_1]$ . A constante de troca ( $K_{\text{ex}}$ ) pode ser escrita como:

$$K_{\text{ex}} = \frac{([\text{CuL}_1]_0 + \Delta[\text{Zn}]_{\text{lab}})_x [\text{Zn}^{2+}]}{([\text{Zn}]_{\text{T}} - [\text{Zn}]_{\text{lab}})_x [\text{Cu}^{2+}]} \quad (25)$$

Após o rearranjo da equação, obtém-se a expressão a seguir:

$$\frac{([\text{Zn}]_{\text{T}} - [\text{Zn}]_{\text{lab}})_x [\text{Cu}^{2+}]}{[\text{Zn}^{2+}]} = \frac{([\text{CuL}_1]_0 + \Delta[\text{Zn}]_{\text{lab}})}{K_{\text{ex}}} \quad (26)$$

Plotando-se o lado esquerdo da Equação 26 em função da  $\Delta[\text{Zn}]_{\text{lab}}$ , obtém-se uma função linear. A constante de troca  $K_{\text{ex}}$  e  $[\text{CuL}_1]_0$  podem ser determinadas através da inclinação da reta e do intercepto da mesma com o eixo y.

Se a maior parte do cobre é complexado por  $\text{L}_1$ , o balanço de massa mostrado na Equação 15 pode ser simplificado da seguinte maneira:

$$[\text{CuL}_1] \approx [\text{CuTD}] \quad (27)$$

E finalmente a constante de troca pode ser reescrita como:

$$K_{\text{ex}} = \frac{[\text{CuTD}]_x [\text{Zn}^{2+}]}{([\text{ZnTD}] - [\text{Zn}]_{\text{lab}})_x [\text{Cu}^{2+}]} \quad (28)$$

Sendo assim, a constante de troca Cu-Zn pode ser obtida a partir dos parâmetros presentes do lado direito da Equação 28.

Dada a dificuldade em se distinguir os diferentes tipos de sítios de ligação presentes em amostras de águas naturais, em função da complexidade deste tipo de matriz, os cálculos desenvolvidos neste trabalho foram realizados considerando-se, para efeito de simplificação, apenas um tipo de sítio de ligação. Obviamente, mesmo naqueles casos onde se considera a existência de dois tipos de sítios de complexação, o sistema está sendo avaliado mediante uma grande simplificação (Xue *et al.*, 1995).

Com base nas equações descritas anteriormente, realizou-se a determinação da constante de troca para o cobre, empregando-se uma amostra de água coletada no reservatório. A constante de troca para o zinco não foi determinada, pois como pode ser observado na Figura 31b, nos níveis de concentração típicos dos metais, nas águas do reservatório, não há quaisquer evidências denotando o deslocamento do cobre devido ao aumento na concentração de zinco. Os valores de cobre livre, foram obtidos a partir do programa MineqL+.

A competição por ligantes e a troca entre cobre e zinco pôde ser demonstrada através da técnica utilizada, a voltametria de redissolução anódica. A seletividade dos ligantes por cobre quando comparada ao zinco, fundamentada na Equação 28, forneceu o valor de constante de troca  $K_{ex} \approx 5,3$ . O aumento de zinco lábil foi observado quando a solução fortificada com este metal foi titulada com cobre, como pode ser observado na Figura 31a. A relação entre as medidas e os cálculos obtidos indica que o cobre compete com o zinco por ligantes fortes e esta competição leva a substituição do zinco e a detecção do aumento de zinco lábil, favorecendo a complexação do cobre.

O fato dos complexos de cobre apresentarem valor de constante de estabilidade condicional maior que os de zinco, mostra que o sistema favorece a complexação do primeiro, embora os valores de concentração de sítios de ligação para o zinco sejam maiores. Este fato contribui para a redução na concentração de cobre livre, resultando em uma razão relativamente elevada para  $[Zn^{2+}]:[Cu^{2+}]$ . Segundo estudos realizados por Xue e Sigg (1990) a toxicidade do cobre livre para algas foi observada em concentrações da ordem de  $10^{-12}$  a  $10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup> e níveis mais elevados de zinco livre são toleráveis pelas microalgas. Desta forma a razão  $[Zn^{2+}]:[Cu^{2+}] = 16$ , encontrada para estes metais nas águas do Reservatório do Iraí, favorece a diminuição da biodisponibilidade do metal mais tóxico neste ambiente aquático.

#### **4.7 Classificação das Microalgas do Reservatório**

O estudo da interação dos metais com microalgas é relevante do ponto de vista ambiental, pois de acordo com Stevenson *et al.* (1996) as trocas que ocorrem com os produtos extracelulares de algas, durante florações fitoplantônicas, podem diminuir a toxicidade do metal. Algumas algas excretam metabólitos secundários em resposta à limitação de micronutrientes e estes metabólitos podem atuar como quelantes reduzindo assim a toxicidade do metal.

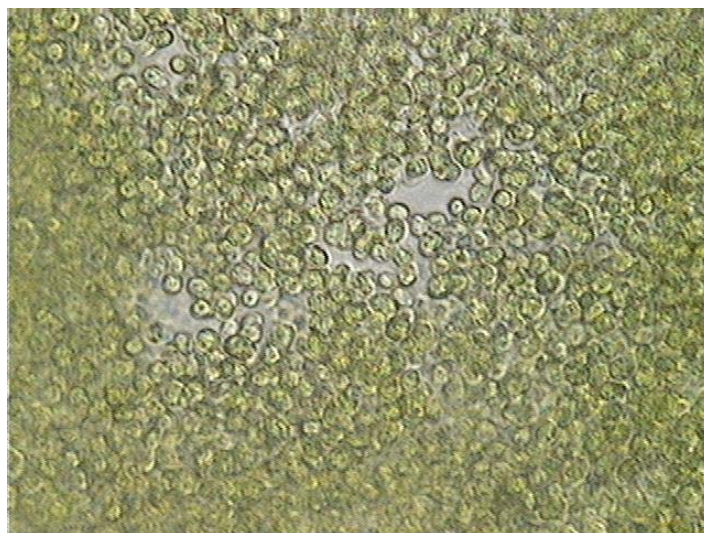
Para este estudo, foram realizadas diversas culturas unialgais das microalgas coletadas no Reservatório do Iraí, a fim de avaliar o comportamento e

a dinâmica da interação dos metais cobre e zinco com os excretados das microalgas. O cultivo das microalgas foi desenvolvido no Centro de Estudos do Mar (CEM) da UFPR, em meio WC sem EDTA, onde as culturas foram mantidas em laboratório sob condições controladas de luminosidade e temperatura, sob responsabilidade da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Teresa Lombardi.

Diferentes espécies de microalgas apresentam comportamentos distintos quanto a sua capacidade de complexar ligantes. Segundo Hassler *et al.* (2005), Abu Al-Rub *et al.* (2005), Tien (2002) e Lombardi *et al.* (2005) a capacidade de complexação varia conforme a espécie e o metal que será complexado.

Com o objetivo de avaliar os resultados obtidos com os excretados, de uma maneira peculiar à espécie que foi cultivada, obteve-se a classificação da família de microalgas obtida da cultura realizada no CEM. A partir do isolamento da microalga, a cultura obtida foi classificada como sendo da família *Chlorella* sp. (Chlorophyceae).

Com o auxílio de um microscópio acoplado a uma câmera fotográfica, foram obtidas diferentes fotografias das culturas, mostradas na Figura 32 a seguir.



**(a)**



**(b)**



**(c)**

**Figura 32.** Imagens da cultura das microalgas **(a)** e **(b)** aumentada 100 vezes; **(c)** aumentada 40 vezes.

Para obter a imagem da Figura 32a e 32b, foi empregada uma lente que possibilitou um aumento de 100 vezes e na Figura 32c, um aumento de 40 vezes.

Os excretados obtidos a partir desta cultura foram utilizados para estudar as interações destes com os metais cobre e zinco, como também a competição entre estes mesmos metais pelos sítios de complexação presentes nestes excretados.



De acordo com Xue e Sigg (1990), a interação do Cu(II) com excretados e superfícies de algas foi estudada com tampões metal-NTA com combinações de diversas técnicas analíticas. Modelos simples de equilíbrio foram utilizados experimentalmente determinando a capacidade de complexação e a constante de equilíbrio, com isso sendo capazes de simular resultados e avaliar a especiação do cobre. Sob condições experimentais, a ligação do cobre a excretados de algas produz efeitos mais significativos na especiação do cobre que a ligação que ocorre na superfície da alga. Estes ligantes extracelulares podem gerar uma importante diminuição da concentração de cobre livre e então mitigar o potencial do efeito tóxico nos organismos.

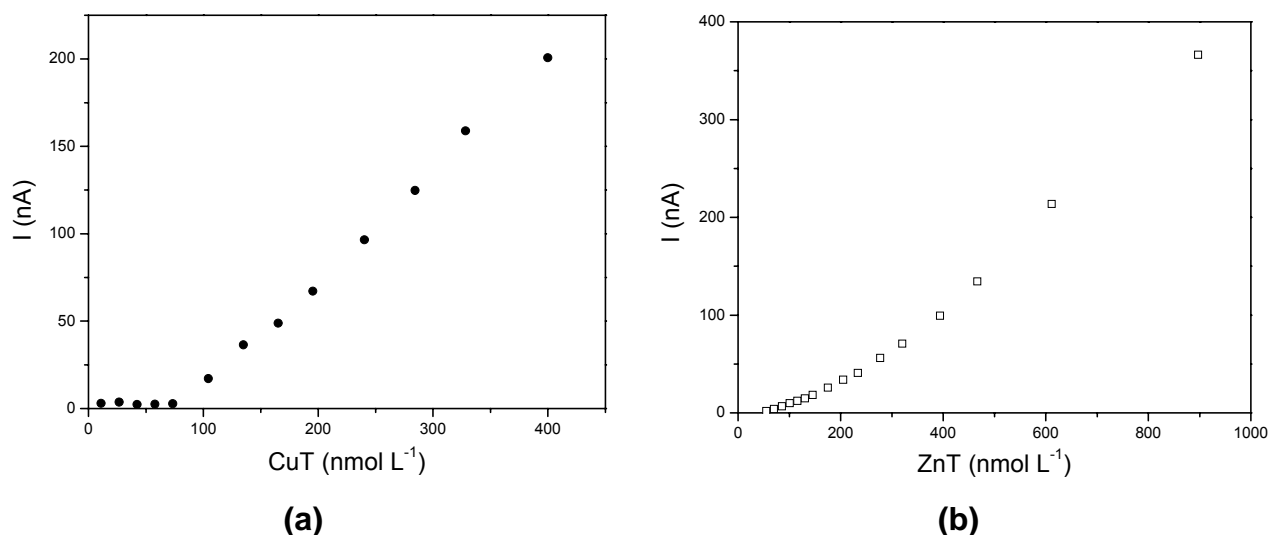
#### **4.8 Avaliação do Comportamento da Capacidade de Complexação dos Excretados de Microalgas Frente aos Metais Cobre e Zinco**

A avaliação da interação metais/microalgas é importante, pois os metais cobre e zinco são elementos essenciais para a atividade biológica, mas podem ser considerados tóxicos em elevadas concentrações. Desta forma, os fitoplânctons podem afetar a especiação química do metal traço, substituindo os ligantes complexados com os metais, assim como o metal que está ligado à superfície, absorvido e sedimentado em águas naturais (Xue e Sigg, 1993).

Com o objetivo de avaliar o comportamento dos metais cobre e zinco nos excretados de microalgas existentes no Reservatório do Irai, realizou-se a titulação dos excretados com estes metais.

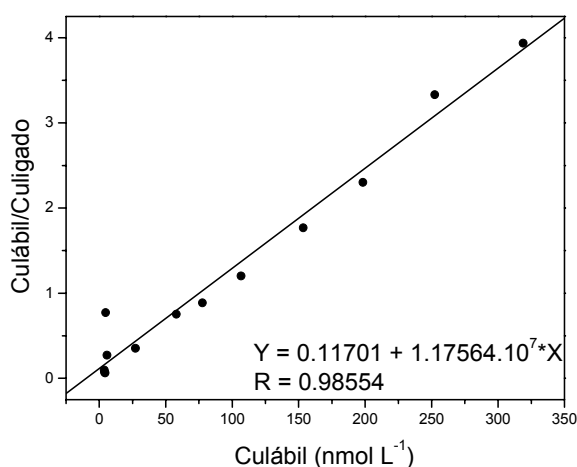
Inúmeros autores, Hassler *et al.* (2005), Abu Al-Rub *et al.* (2005), Tien (2002) e Lombardi *et al.* (2005) avaliaram a capacidade de complexação de metais, dentre eles cobre e zinco, na superfície de microalgas e nos produtos liberados de seus excretados, constituídos majoritariamente por matéria orgânica natural, recém produzida, composta por carboidratos e aminoácidos. Segundo Tien (2002), dentre diversas espécies, a *Chlorella vulgaris* apresenta uma elevada capacidade de complexação dos íons cobre.

Da mesma forma que as amostras de água do reservatório foram tituladas, titulou-se os excretados com os metais cobre e zinco, separadamente. Na Figura 33a e 33b a seguir, estão apresentadas as curvas de titulação para o cobre e zinco respectivamente.

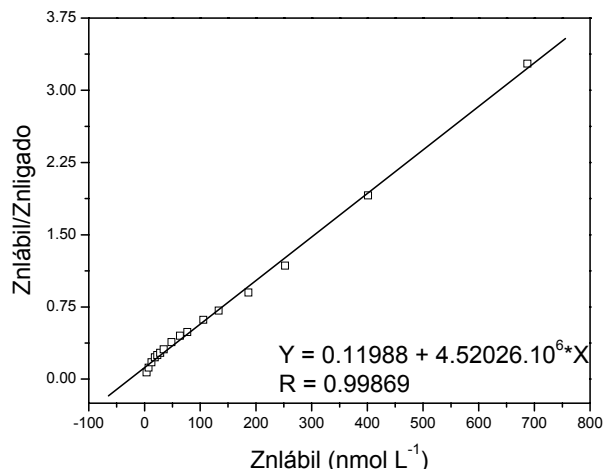


**Figura 33.** Voltamogramas referentes às titulações dos excretados das microalgas. **(a)** Titulação com  $\text{Cu}^{2+}$  ( $500 \mu\text{g L}^{-1}$ ); **(b)** titulação com  $\text{Zn}^{2+}$  ( $500 \mu\text{g L}^{-1}$ ). I:  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em  $\text{KNO}_3$ ;  $E_{\text{dep}}: -1,2 \text{ V}$  (vs  $\text{Ag/AgCl}$ );  $\text{Cu}^{2+}$ :  $E_i: -0,6 \text{ V}$  e  $E_f: 0,15 \text{ V}$ ;  $\text{Zn}^{2+}$ :  $E_i: -1,2 \text{ V}$  e  $E_f: -0,6 \text{ V}$ ;  $t_{\text{dep}}: 600 \text{ s}$ ; amplitude do pulso:  $50 \text{ mV}$ ; velocidade de varredura:  $8 \text{ mV s}^{-1}$ ; purga entre as adições:  $180 \text{ seg.}$ ; tempo de equilíbrio:  $20 \text{ min.}$

Assim como nas amostras de água natural do reservatório, os excretados apresentaram um comportamento distinto quando comparadas às curvas de titulação envolvendo o cobre e o zinco, como demonstrado na Figura 33. Da mesma forma que na titulação das amostras de água, os excretados foram titulados até atingir a capacidade de complexação e a obtenção de um comportamento linear para ambas as curvas. O valor do pH nos excretados determinado antes e após as titulações, foi de  $6,0$  e o valor de clorofila-a nesta cultura foi de  $2,05 \text{ mg L}^{-1}$ . Na Figura 34a e 34b abaixo, estão apresentados os gráficos referentes à capacidade de complexação do cobre e zinco, respectivamente.



(a)



(b)

**Figura 34.** Determinação das capacidades de complexação, baseada na Linearização de Ruzic, dos excretados das microalgas. **(a)** cobre; **(b)** zinco.

Como pode ser observado na Figura 34a e 34b, esta metodologia apresentou um coeficiente de correlação satisfatório para a titulação com os excretados. Para o cobre resultou em 0,98554 e para o zinco 0,99869, evidenciando que os dados gerados nas titulações apresentam elevada confiabilidade. Como foram realizadas duplicatas destas titulações, os valores médios apresentados foram de  $\text{Log } K' = 8,00$  e  $[\text{L}]_{\text{TOTAL}} = 90,14 \text{ nmol L}^{-1}$  para o cobre e  $\text{Log } K' = 7,45$  e  $[\text{L}]_{\text{TOTAL}} = 267,3 \text{ nmol L}^{-1}$  para o zinco.

Os valores da capacidade de complexação dos metais nos excretados de microalgas foram obtidos da mesma forma que para as amostras de água do reservatório, através da Linearização de Ruzic, considerando apenas um modelo de ligantes (Mylon *et al.*, 2003; Ruzic, 1982). Na Tabela abaixo estão descritos estes valores, para uma das titulações realizadas, além das concentrações de metal total recuperável e dissolvido.

**Tabela 11.** Concentrações de cobre e zinco total dissolvido e parâmetros obtidos através da determinação da capacidade de complexação realizada nos excretados.

Parâmetros	Unidade	Cobre	Zinco
Metal Total Recuperável (MTR)		16,99	59,09
Metal Total Dissolvido (MTD)		11,01	54,97
Metal Lábil ( $M_{lab}$ )	nmol L <sup>-1</sup>	4,79	3,62
Metal Livre ( $M_{liv}$ )		3,03	3,62
Metal Complexado (ML)		6,22	51,35
[L] <sub>TOTAL</sub>		85,06	221,23
Log $K'$	-	8,00	7,58

Como pode ser observado na Tabela 11, os dados obtidos nestas titulações são semelhantes aos dados obtidos nas amostras coletadas mensalmente no reservatório, ou seja, também foram determinadas concentrações maiores de sítios disponíveis ( $[L]_{TOTAL}$ ) para zinco, enquanto os complexos formados com o cobre apresentaram maiores valores de constante de estabilidade condicionais ( $K'_{ML}$ ).

No estudo realizado por Knauer e colaboradores (1997), cinco espécies de algas verdes unicelulares foram expostas a uma larga concentração de  $Cu^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  para examinar a relação entre a concentração de cobre livre e zinco livre, ( $Cu^{2+}$  e  $Zn^{2+}$ ) e o crescimento das algas em relevantes concentrações dos metais para fitoplânctons de águas naturais. No estudo de Knauer *et al.* (1997), determinaram-se as concentrações totais dos metais e a adsorção de cobre e zinco à superfície das algas. Uma das famílias de algas avaliada no estudo de Knauer e colaboradores, semelhante àquela encontrada no Reservatório do Iraí e cultivada em laboratório, a *Chlorella* sp., apresentou um ótimo crescimento frente a concentrações de cobre variando de  $10^{-13}$  a  $10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup>. O crescimento das algas mostra a tolerância com relação às concentrações relativamente altas de cobre e zinco intracelular. Isto sugere que as células podem imobilizar o metal intracelularmente. A partir das variações de concentrações experimentais avaliadas por estes autores, nota-se que a afinidade do cobre por superfícies de algas é maior que o zinco, sendo assim, a constante de adsorção avaliada para o

cobre foi de  $\text{Log } K' \text{ Cu}$  (11,06) enquanto para o zinco  $\text{Log } K' \text{ Zn}$  (6,49), em  $\text{pH} = 7,9$ . A tolerância das algas por altas concentrações de  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  em águas naturais é maior que de espécies de algas marinhas. Considerando o lago avaliado no estudo de Knauer e colaboradores (1997), os resultados obtidos para a cultura de algas indicam a possibilidade do cobre agir como fator limitante para certas espécies algais em lagos eutrofizados.

O estudo realizado por Lombardi e colaboradores (2005) mostra que os produtos liberados da cultura da microalga *Scenedesmus acuminatus* é constituído de ligantes orgânicos de altas e baixas massas molares. Os resultados obtidos mostram que as propriedades de complexação dos excretados, material produzido pelas células das algas, foram caracterizados pela presença de dois tipos de ligantes, um forte ( $\text{Log } K'_1 = 7,3$ ) e um fraco ( $\text{Log } K'_2 = 6,3$ ). Os complexos fortes de cobre foram associados a compostos de baixa massa molar, enquanto os fracos relacionados aos de maior massa molar. Estes resultados estão de acordo com outros da literatura, quais descrevem a liberação de excretados de microalgas da classe *Chlorophyceae*.

Abu Al-Rub *et al.* (2005) investigou a potencialidade da *Chlorella vulgaris* na remoção de cobre em águas naturais. Além deste metal, avaliou também a presença dos metais zinco e chumbo. Os resultados mostraram que esta alga é efetiva na remoção de cobre em soluções aquosas mas, na presença dos metais zinco e chumbo, a alga diminui sua capacidade de adsorver o cobre.

Tien (2002) avaliou a adsorção dos metais  $\text{Cu(II)}$ ,  $\text{Cd(II)}$  e  $\text{Pb(II)}$ , em quatro espécies de algas, *Chlorella vulgaris*, *Oscillatoria limnetica*, *Anabeana spiroides* e *Eudorina elegans*, todas de águas naturais. A competição entre os metais pelos sítios de ligação presentes na superfície das algas mostrou-se dependente da espécie e do íon metálico. Os resultados demonstraram que as algas possuem uma elevada capacidade de adsorção frente ao cobre, cádmio e especialmente ao chumbo. Estes resultados indicam que diversas espécies de algas possuem a capacidade de adsorver metais, diminuindo sua biodisponibilidade em águas naturais.

#### 4.9 Competição dos Metais Cobre e Zinco por Sítios de Ligação Disponíveis nos Excretados das Microalgas

Enquanto a superfície das algas possui diferentes grupos carboxílicos, hidroxilas, sulfato e outros provenientes dos carboidratos, proteínas e lipídeos, que diferem em afinidade e especificidade (Tien, 2002), entre a grande variedade de compostos que constituem os excretados de microalgas, carboidratos e polissacarídeos correspondem a fração significativa da matéria orgânica total produzida por estes organismos (Lombardi *et al.*, 2005).

A partir dos dados de capacidade de complexação, mais especificamente, dos valores de sítios de complexação ( $[L]_{TOTAL}$ ), obtidos separadamente nas titulações de cobre e zinco nos excretados de microalgas, obteve-se os valores correspondentes à concentração dos metais, a serem adicionados antes da titulação, para fortificação das amostras.

Na tabela abaixo, estão demonstrados os valores para uma das capacidades de complexação realizadas com os excretados, a qual foi utilizada para determinar as concentrações dos metais cobre e zinco necessárias para realizar a competição.

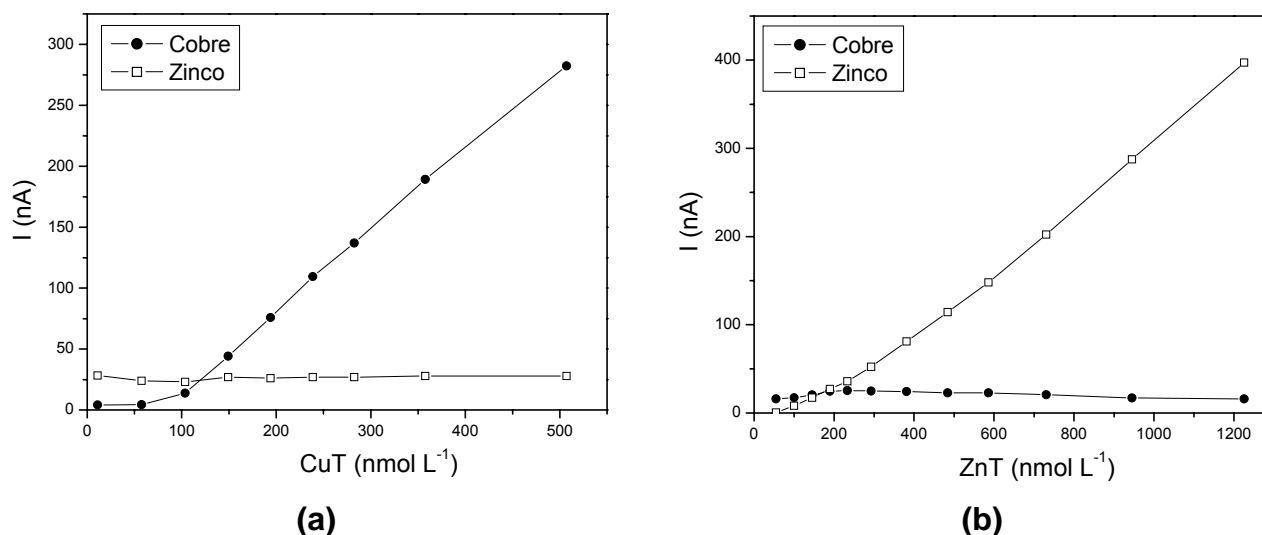
**Tabela 12.** Valores de cobre e zinco total dissolvido e recuperável determinados nos excretados e parâmetros obtidos através do experimento de determinação da capacidade de complexação na titulação dos excretados com os mesmos metais.

Parâmetros	Unidade	Cobre	Zinco
Metal Total Recuperável (MTR)		16,99	59,09
Metal Total Dissolvido (MTD)		11,01	54,97
Metal Lábil ( $M_{lab}$ )	nmol L <sup>-1</sup>	4,79	1,20
Metal Livre ( $M_{liv}$ )		3,03	1,20
Metal Complexado (ML)		6,22	42,92
$[L]_{TOTAL}$		85,06	313,46
Log $K'$	-	8,00	7,33

De posse destes valores, realizou-se os experimentos envolvendo a competição entre os metais pelos sítios de complexação já ocupados pela adição

de um dos dois metais (cobre ou zinco), no dia anterior à titulação. Após a fortificação das amostras com cobre e zinco, separadamente, as mesmas foram deixadas em repouso por um período de 15 h. No dia seguinte à adição, realizou-se a titulação com o outro metal.

A Figura 35a a seguir, representa a titulação dos excretados com  $\text{Cu}^{2+}$ , após a fortificação da amostra com  $\text{Zn}^{2+}$  e a Figura 35b exatamente o oposto, ou seja, a titulação com  $\text{Zn}^{2+}$  após a fortificação do meio com  $\text{Cu}^{2+}$ .



**Figura 35.** Curva de titulação referente à competição entre os metais cobre e zinco; **(a)** Adição de  $\text{Zn}^{2+}$  e titulação com  $\text{Cu}^{2+}$  (500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ); **(b)** Adição de  $\text{Cu}^{2+}$  e titulação com  $\text{Zn}^{2+}$  (500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). I: 0,1 mol L<sup>-1</sup> em  $\text{KNO}_3$ ;  $E_{\text{dep}}$ : -1,2 V (vs Ag/AgCl);  $\text{Cu}^{2+}$ :  $E_i$ : -0,6 V e  $E_f$ : 0,15 V;  $\text{Zn}^{2+}$ :  $E_i$ : -1,2 V e  $E_f$ : -0,6 V;  $t_{\text{dep}}$ : 600 s; amplitude do pulso: 50 mV; velocidade de varredura: 8 mV s<sup>-1</sup>; purga entre as adições: 180 seg.; tempo de equilíbrio: 20 min.

Os gráficos mostrados na Figura 35a e 35b descrevem o comportamento do sistema frente a competição entre os metais cobre e zinco, monitorando simultaneamente a fortificação da amostra com zinco e cobre, respectivamente. Como pode ser observado na Figura 35a, onde os excretados foram fortificados com zinco e posteriormente titulados com cobre. No início, a curva de titulação apresenta uma diferença na sua inclinação, indicando que os excretados possuem capacidade de complexar cobre. Nas primeiras adições, a corrente do cobre

praticamente não varia, pois todo metal adicionado está sendo complexado pelos sítios disponíveis nos excretados. A variação na corrente deste metal só ocorre após a adição de uma dada concentração de cobre, ou seja, aquela que ultrapassa a capacidade de complexação do sistema. Durante a titulação com cobre, monitorou-se a corrente do zinco e como pode ser observado, este metal não apresentou variações significativas, ou seja, ele não deslocou sítios por ele ocupados, para favorecer a complexação do cobre. O mesmo comportamento foi observado na Figura 35b, ou seja, a titulação com zinco não deslocou o cobre inicialmente complexado com os sítios disponíveis nos excretados e apresentou uma capacidade de complexação para os sítios de ligação presentes nos excretados das microalgas frente ao zinco. Analisando estes resultados, pode-se concluir que os excretados possuem capacidade de complexação para o cobre e zinco, mesmo a amostra estando fortificada com zinco ou cobre em concentrações elevadas. A partir destes resultados, observou-se um comportamento distinto na competição destes metais pelos sítios de complexação existentes nos excretados da cultura de microalgas e nos sítios de complexação existentes na amostra de água do Reservatório do Iraí. Esta diferença pode ser relacionada à especificidade dos ligantes que constituem os excretados, ou seja, pode ser devido à existência de sítios favoráveis a cada metal. Foram realizadas duplicatas destas titulações. Os valores médios obtidos foram de  $\text{Log } K' = 7,85$  e  $[\text{L}]_{\text{TOTAL}} = 76,50 \text{ nmol L}^{-1}$  para o cobre e  $\text{Log } K' = 7,30$  e  $[\text{L}]_{\text{TOTAL}} = 219,9 \text{ nmol L}^{-1}$  para o zinco.

Na Tabela 13 a seguir, estão apresentados os resultados obtidos através da titulação descrita acima, ou seja, uma das titulações de competição entre os metais com os excretados de microalgas.



**Tabela 13.** Valores de cobre e zinco adicionados nos excretados para realizar a titulação e parâmetros obtidos através da determinação da capacidade de complexação da competição entre os metais cobre e zinco por sítios disponíveis nos excretados.

Parâmetros de Complexação	Unidade	Cobre	Zinco
Metal adicionado para competição		97,25	227,36
Metal Lábil ( $M_{lab}$ )		6,08	1,51
Metal Livre ( $M_{liv}$ )	nmol L <sup>-1</sup>	3,03	1,51
Metal Complexado (ML)		4,93	53,46
[L] <sub>TOTAL</sub>		89,42	219,93
Log $K'$	-	7,53	7,40

Devido a não variação da corrente dos metais cobre e zinco adicionados no dia anterior a titulação, pode-se avaliar que não há uma competição entre os metais por sítios já ocupados devido a fortificação da amostra. Desta forma não foi possível realizar a determinação da constante de troca ( $K_{ex}$ ).

Estes resultados podem ser associados à especificidade dos ligantes. A matéria orgânica contida nos excretados, é recém formada e composta por carboidratos e aminoácidos, que podem ser seletivos a complexação com metais específicos. Com isso, pode-se concluir através da observação da Figura 35, que por não existir um deslocamento de ambos os metais quando ocorre a competição, deve-se ao fato de existir nos excretados sítios específicos para cada metal.

Segundo Lombardi *et al.* (2005) os ligantes que complexam cobre, liberados pelas microalgas, podem reduzir a atividade destes metais no ambiente, diminuindo desta forma, sua biodisponibilidade.

Os resultados referentes à competição de cobre e zinco pelos sítios nos excretados de microalgas, não podem ser amparados pela literatura, uma vez que este trabalho ainda é inédito.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos através das análises dos parâmetros principais e das coletas sistemáticas, realizadas durante um ciclo hidrológico no Reservatório do Iraí, forneceram dados que permitem avaliar, no contexto geral, o comportamento e a dinâmica dos metais cobre e zinco.

Para dar início ao desenvolvimento da dissertação, foi necessário realizar um trabalho prévio de adequação dos métodos analíticos utilizados, às características do ambiente a ser estudado, em função das baixas concentrações determinadas nas amostras de águas do reservatório. A partir da otimização das condições experimentais, determinou-se os eletrólitos de suporte  $\text{HNO}_3$  para a determinação das frações recuperável e dissolvida e  $\text{KNO}_3$  para as espécies metálicas lábeis.

As frações total recuperável e dissolvida foram determinadas através da técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização em Forno de Grafite (AA-6800 Shimadzu). A fração lábil dos mesmos metais foi determinada por meio de titulações das amostras, separadamente para cada metal, empregando-se Voltametria de Redissolução Anódica (VRA), onde foram determinadas as concentrações dos metais cobre e zinco lábeis e complexados. A aplicação do método da Linearização de Ruzic permitiu a obtenção dos valores de concentração dos sítios de complexação disponíveis ( $[\text{L}]_{\text{TOTAL}}$ ) e a constante de estabilidade condicional ( $K'_{\text{ML}}$ ). A fração livre foi determinada a partir do cálculo de equilíbrio químico, utilizando o programa MineqL+.

Apesar dos resultados observados para os parâmetros relativos à qualidade de águas, pH, oxigênio dissolvido, alcalinidade total, carbono orgânico dissolvido, sólidos suspensos totais e cloreto, não demonstrarem que o reservatório receba quantidades significativas de esgoto doméstico, suas águas sofrem com frequência um processo de florescimento excessivo de microalgas. Esse processo foi detectado e acompanhado através da determinação dos níveis de clorofila-a, sendo que o Reservatório do Iraí pode ser considerado um ambiente aquático eutrofizado.

Os metais apresentaram comportamentos distintos no corpo de água. O zinco encontra-se em maior concentração nas frações recuperável e dissolvida, quando comparado ao cobre. No entanto, o cobre mostrou uma afinidade ligeiramente superior pelo material particulado em suspensão.

Avaliando os coeficientes de partição observa-se que há distinção entre o comportamento do cobre e do zinco em função dos teores de sólidos em suspensão, embora ambos apresentem uma correlação decrescente entre estes parâmetros. Na maioria das amostras o  $\text{Log } K_D$  para o cobre foi maior que o  $\text{Log } K_D$  para o zinco. Isto se deve ao fato de que o zinco parece estar preferencialmente associado a sólidos de natureza coloidal, que passam pela membrana de filtração. Fundamentado nisso, supõe-se que a remoção do metal a partir da coluna de água por sedimentação ocorra de forma mais acentuada para o cobre, em contrapartida ao comportamento notado para o zinco.

Observando o comportamento dos dois metais em função dos agentes complexantes presentes nas águas e da constante de estabilidade condicional, fica evidente que as águas apresentam uma maior capacidade de complexação para o zinco quando comparado ao cobre, entretanto, quando observamos o  $\text{Log } K'$ , o comportamento é inverso. De uma maneira geral, os complexos Cu-MOD apresentaram valores superiores para  $\text{Log } K'$ . Supõe-se que a diferença nas concentrações de sítios disponíveis para a complexação dos metais se de pela liberação de excretados que sejam capazes de promover uma diminuição na concentração de zinco biodisponível, embora os sítios ocupados pelo cobre sejam considerados mais fortes que aqueles ocupados pelo zinco.

Uma característica importante na especiação dos metais nas águas do reservatório deve ser ressaltada. Na medida em que ocorreu um aumento da concentração do metal na fração dissolvida, notou-se uma tendência de sítios de complexação tornarem-se ocupados por estes metais. Isto pode estar relacionado a uma resposta da comunidade fitoplanctônica presente no reservatório, no sentido de produzir um material capaz de complexar tanto o cobre quanto o zinco. Este comportamento pode representar uma maneira das microalgas controlarem

os níveis de concentração das formas mais biodisponíveis dos metais, minimizando, dessa forma, seu potencial tóxico.

Analisando a variação das concentrações de metais complexados em função do carbono orgânico dissolvido, os dados obtidos indicaram que com o aumento nos níveis de COD, o comportamento dos metais é semelhante, ou seja, os valores das concentrações dos metais complexados permanecem praticamente constantes. Portanto, pode-se supor que o dado quantitativo de COD não seja suficiente para explicar o comportamento de complexação dos metais.

A avaliação da capacidade de complexação ( $[L]_{TOTAL}$ ) em função dos teores de carbono orgânico dissolvido indicou que os sítios de complexação associados à matéria orgânica dissolvida exercem um importante papel na complexação do zinco nestas águas, pois nota-se que o aumento da concentração de carbono orgânico dissolvido proporciona maiores valores de capacidades de complexação. No entanto para o cobre, foi observado um comportamento inverso, isto é, a matéria orgânica não oferece capacidade de complexação a este metal.

As titulações de competição entre os metais cobre e zinco pelos sítios complexantes disponíveis na amostra de água do Reservatório do Iraí expressaram resultados distintos para os metais. O cobre compete pelos sítios já ocupados pelo zinco, enquanto o zinco, nas adições iniciais, não compete pelos sítios já ocupados pelo cobre. Desta forma, praticamente todo o zinco adicionado durante a titulação permaneceu na forma lábil. A partir dos dados obtidos na capacidade de complexação da titulação da competição e do método da Linearização de Ruzic, a constante de troca ( $K_{ex} \approx 5,3$ ), demonstra a preferência da complexação dos sítios pelo cobre em relação ao zinco.

A partir do conhecimento prévio sobre a especiação dos metais cobre e zinco e como também do conhecimento de aspectos de natureza ecotoxicológica, foi favorecido o entendimento sobre as conclusões obtidas através da PCA. A análise de componentes principais consiste de um método que tem como finalidade básica a redução de dados a partir de combinações lineares sobre determinadas variáveis originais. Este tipo de análise pode resumir em poucas dimensões a maior parte da variabilidade de uma matriz de dados constituída por

um grande número de variáveis, sem entretanto comprometer ou alterar as informações importantes. Esta avaliação foi relevante na avaliação do comportamento e a dinâmica da especiação dos metais cobre e zinco e a interação com os parâmetros analíticos, nas águas do Reservatório do Iraí.

A análise de componentes principais confirmou a avaliação dos resultados obtidos através na análise univariada, isto é, clorofila-a e carbono orgânico dissolvido apresentam uma relação clara e objetiva. Esta evidência pode ser explicada pelo fato dos excretados das microalgas serem majoritariamente constituídos por carboidratos e aminoácidos. Como a determinação de carbono orgânico dissolvido não permite a distinção dos componentes, pode-se concluir que grande parte da matéria orgânica presente no ambiente aquático é originária de excretados de microalgas. A análise univariada também permitiu concluir que os teores de sólidos suspensos totais estão diretamente relacionados aos teores de clorofila-a. Na PCA, por sua vez, esta relação não ficou evidenciada através dos valores mínimos ou máximos nas amostras. No entanto, pôde-se observar que em todas as análises realizadas, este parâmetro encontrou-se sempre associado ao mesmo quadrante que clorofila-a e carbono orgânico dissolvido, evidenciando, desta forma, a associação destas variáveis.

Apesar do pequeno número de amostras e grande número de variáveis, este estudo demonstrou que há múltiplas possibilidades de se avaliar o comportamento dos metais. A Análise de Componentes Principais sugeriu algumas tendências que correlacionaram os resultados das análises realizadas de uma maneira bastante clara, objetiva e satisfatória.

A partir da coleta das microalgas presentes nas águas do Reservatório do Iraí foram realizadas diversas culturas, a fim de avaliar a capacidade de complexação e a competição entre os metais cobre e zinco frente aos excretados destas microalgas. Avaliando a capacidade de complexação dos metais cobre e zinco nos excretados, o comportamento dos metais foi similar aquele obtido nas águas do Reservatório do Iraí, apresentando valores médios mais elevados para a constante de estabilidade condicional do cobre, e maiores concentrações médias de sítios disponíveis para o zinco.

De forma semelhante, também se avaliou a titulação de competição entre os metais cobre e zinco por sítios de complexação disponíveis nos excretados das culturas desenvolvidas em laboratório e os resultados evidenciaram comportamentos semelhantes entre os metais. Mais do que isto, os resultados para a capacidade de complexação dos metais nos excretados foi similar aos obtidos nas águas do reservatório, ou seja, foram determinadas concentrações superiores de sítios de complexação para o zinco. Por outro lado os complexos envolvendo cobre foram os que apresentaram maior força de ligação, expressa em termos de  $\text{Log } K'$ . Porém, não ficou evidenciada uma competição por sítios presentes nos excretados, sugerindo desta forma a presença, nesse material, de sítios específicos de ligação para cada metal.

Este trabalho abrangeu muitos aspectos importantes dentro da área ambiental. As determinações das concentrações dos metais cobre e zinco totais recuperáveis, dissolvidas, lábeis, livres, complexadas, a interação com os excretados das microalgas e com a matéria orgânica, dentre outros diversos parâmetros, denotaram a ele um caráter e uma importância singular. Estudar a especiação dos metais e avaliar seu comportamento e dinâmica promove o entendimento do real comportamento destas espécies em diversos níveis da sua organização, seja química ou biológica, contribuindo desta forma, para o real conhecimento de processos ambientais relacionados à sua acumulação, transferência trófica, biodisponibilidade e, conseqüentemente, seus efeitos tóxicos dentro do ecossistema.

O caráter inovador deste estudo está em não se restringir apenas ao contexto da química ambiental de vertente meramente analítica, especificamente da monitoração ambiental, mas em considerar a interdisciplinaridade, envolvendo a química e ecologia, notadamente a limnologia e a ficologia. Desta forma, fica evidente que as inter-relações das diversas áreas proporcionam um aprimoramento e uma dimensão ainda maior para os resultados de um trabalho desenvolvido na área da química ambiental.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abril, G.; Frankignoulle, M. Nitrogen-alkalinity interactions in the highly polluted Scheldt basin (Belgium). *Water Res.* **2001**, 35, 844.
- Abu Al-Rub, F. A.; El-Naas, M. H.; Ashour, I.; Al-Marzoqui, M. Biosorption of copper on *Chlorella vulgaris* from single, binary and ternary metal aqueous solutions. *Process Biochemistry*. **2005**, in press.
- Agostinho, S. M. L.; Villamil, R. F. V.; Neto, A. A.; Aranha, H. O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. *Quim. Nova*. **2004**, 27, 813.
- Aleixo, L. M. Voltametria: Conceitos e Técnicas. *ChemKeys*. Disponível on-line: [www.chemkeys.com](http://www.chemkeys.com), março/**2003**.
- Allen, H. E.; Hansen, D. J. The importance of chemical speciation to water quality criteria. *Water Environ. Res.* **1996**, 68, 42.
- Alonso, E.; Santos, A.; Callejón, M.; Jiménez, J.C. Speciation as a screening tool for the determination of heavy metal surface water pollution in the Guadiana river basin. *Chemosphere*. **2004**, 56, 561.
- Andreoli, C. V.; Dalarmi, O.; Lara, A. I.; Andreoli, F. N. Os Mananciais de Abastecimento do Sistema Integrado da Região Metropolitana de Curitiba – RMC – 9º SILUBESA – Simpósio Brasileiro de Engenharia Sanitária e ambiental. Anais, Porto Seguro, abr. p. 196-205, **2000**.
- Antonietti, R.; Sartore, F. Optimization of parameters used for freshwater survey. *Wat. Res.***1996**, 30, 1535.
- APHA; AWWA; WEF; Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington. 19ed., **1995**.
- Baird, C. Química Ambiental. Porto Alegre. Bookman, 2ed., **2002**.
- Belmont-Hébert, B.; Tercier, M.-L.; Buffle, J.; Fiaccabrino, G. C.; DeRooij, N. F.; Koudelka-Hep, M. Gel-integrated microelectrode arrays for direct voltammetric measurements of heavy metals in natural waters and other complex media. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 2949.
- Benoit, G.; Hunter, K. S.; Rozan, T. F. Sources of trace metal contamination artifacts during collection, handling, and analysis of freshwaters. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 1006.

- Benoit, G.; Oktay-Marshall, S. D.; Cantu II, A.; Hood, E. M.; Coleman, C. H.; Corapcioglu, M. O.; Santschi, P. H. Partitioning of Cu, Pb, Ag, Zn, Fe, Al and Mn between filter-retained particles, colloids, and solution in six Texas estuaries. *Mar. Chem.* **1994**, *45*, 307.
- Benoit, G.; Rozan, T. F. The influence of size distribution on the particle concentration effect and trace metal partitioning in rivers. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **1999**, *63*, 113.
- Bruland, K. W.; Donat, J. R.; Hutchins, D. A. Interactive influences of bioreactive trace metals on biological production in oceanic waters. *Limnol. Oceanogr.* **1991**, *36*, 1555.
- Bruland, K. W.; Rue, L.; Donat, J. R.; Skrabal, S. A.; Moffett, J. W. Intercomparison of voltammetric techniques to determine the chemical speciation of dissolved copper in a coastal seawater sample. *Anal. Chim. Acta.* **2000**, *405*, 99.
- Burba, P.; Aster, B.; Nifant'eva, T.; Shkinev, V.; Spivakov, B. Y. Membrane filtration studies of aquatic humic substances and their metal species: a concise overview Part 1. Analytical fractionation by means of sequential-stage ultrafiltration. *Talanta.* **1998**, *45*, 977.
- Cabaniss, S. E.; Shuman, M. S. Copper binding by dissolved organic matter: I. Suwannee River fulvic acid equilibria. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **1988**, *52*, 185.
- Campbell, P. G. C.; Twiss, M. R.; Wilkinson, K. J.; Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells: implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **1997**, *54*, 2543.
- Campos, M. L. A. M.; Bendo, A.; Viel, F. Métodos de baixo custo para purificação de reagentes e controle da contaminação para determinação de metais traços em águas naturais. *Quím. Nova.* **2002**, *25*, 808.
- Campos, M. L. A. M.; van den Berg, C. M. G. Determination of copper complexation in sea-water by cathodic stripping voltammetry and ligand competition with salicylaldoxime. *Anal. Chim. Acta.* **1994**, *284*, 481.
- Ceresa, A.; Sokalski, T.; Pretsch, E. Influence of key parameters on the lower detection limit and response function of solvent polymeric membrane ion-selective electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *501*, 70.
- Conama. Resolução 020-1986. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente [<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res2086.html>], 1986.



- Conama. Resolução 357-2005. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente [<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>], 2005.
- Davison, W.; Zhang, H. In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. *Nature*. **1994**, 367, 546.
- Esteves, F. de A. Fundamentos de Limnologia. Rio de Janeiro. Interciência, 2ed., **1998**.
- Fatin-Rouge, N.; Milon, A.; Buffle, J.; Goulet, R. R.; Tessier, A. Diffusion and partitioning of solutes in agarose hydrogels: the relative influence of electrostatic and specific interactions. *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 12126.
- Fernandez, L. F.; Lagos, P. E. Florações de Cianobactérias e Eutrofização no Reservatório do Iraí, Curitiba, PR. I: Sucessão Sazonal do Fitoplâncton. IV Seminário de Projeto Interdisciplinar sobre Eutrofização de Águas de Abastecimento Público na Bacia do Altíssimo Iguaçu, Curitiba – PR, 18 e 19 de novembro de **2003**.
- Fernandez, L. F.; Lagos, P. E.; Ventura, C. Florações de Cianobactérias e Eutrofização no Reservatório do Iraí, Curitiba, PR. II: Distribuição Horizontal de Algumas Espécies. IV Seminário de Projeto Interdisciplinar sobre Eutrofização de Águas de Abastecimento Público na Bacia do Altíssimo Iguaçu, Curitiba – PR, 18 e 19 de novembro de **2003**.
- Florence, T. M. The speciation of trace elements in waters. *Talanta*. **1982**, 29, 345.
- Florence, T. M.; Lumsden, B. G.; Fardy, J. J. Evaluation of some physico-chemical techniques for the determination of the fraction of dissolved copper toxic to the marine diatom *Nitzschia closterium*. *Anal. Chim. Acta*. **1983**, 151, 281.
- FluoroProbe. Disponível on-line em [http://www.bbemoldaenke.de/english/fluoroprobe\\_e.html](http://www.bbemoldaenke.de/english/fluoroprobe_e.html) Data de acesso: 27/04/**2005**.
- Fones, G. R.; Davison, W.; Holby, O.; Jørgensen, B. B.; Thamdrup, B. High-resolution metal gradients measured by in situ DGT/DET deployment in Black Sea sediments using an autonomous benthic lander. *Limnol. Oceanogr.* **2001**, 46, 982.
- Gazeta do Povo. Represa do Iraí: Técnicos da Sanepar tentam evitar excesso de algas. Disponível on-line em <http://tudoparana.globo.com/noticias/parana/n-40684.html>. Data de acesso: 04/10/**2003**.
- Google Earth 3.0.0762 Build date: 17/11/2005 Disponível na web em <http://earth.google.com>

- Goyer, R. A. Toxic effects of metals. Em. Klaassen, C. D. (Coord.). Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons. Nova Iorque. McGraw-Hill, 5ed., **1996**.
- Grassi, M. T.; Shi, B.; Allen, H. E. Partition of copper between dissolved and particulate phases using aluminum oxide as an aquatic model phase: Effects of pH, solids and organic matter. *J. Braz. Chem. Soc.* **2000**, *11*, 516.
- Grassi, M. T. As águas do planeta Terra. *Quím. Nova na Escola. Cadernos Temáticos.* **2001**, *4*, 31.
- Guillard, R. R. L.; Lorenzen, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllide-c. *J. of Phycology.* **1972**, *8*, 10.
- Gundersen, P.; Steinnes, E. Influence of pH and TOC concentrations on Cu, Zn, Cd and Al speciation in rivers. *Water Res.* **2003**, *37*, 307.
- Guyton, A. C. Tratado de fisiologia médica. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 8ed., **1992**.
- Gwynfryn, J. J. Freshwater ecosystems structure and response. *Ecotox. and Environ. Safety.* **2001**, *50*, 107.
- Han, N.; Thompson, M. L. Copper-binding of dissolved organic matter derived from anaerobically digested biosolids. *J. Environ. Qual.* **1999**, *28*, 939.
- Harris, D. C. Quantitative Chemical Analysis. W.H. Freeman and Company, 5ed., **1998**.
- Harsh, J. B.; Doner, H. E. Specific adsorption of copper on an hydroxy-aluminium-montmorillonite complex. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* **1984**, *48*, 1034.
- Hassler, C. S.; Behra, R.; Wilkinson, K. J. Impact of zinc acclimation on bioaccumulation and homeostasis in *Chlorella kesslerii*. *Aquatic Toxicology.* **2005**, *74*, 139.
- Holm; Hansen, O.; Riemann, B. Chlorophyll-a determination: improvements in methodology. *OIKOS.* **1978**, *30*, 438.
- Honeyman, B. D.; Santschi, P. H. Metals in aquatic systems. *Environ. Sci. Technol.* **1988**, *22*, 862.
- Hudson, R. J. M. Which aqueous species control the rates of trace metal uptake by aquatic biota? Observations and predictions of non-equilibrium effects. *Sci. Total Environ.* **1998**, *219*, 95.

- Jackson, G. A. TEP and coagulation during a mesocosm experiment. *Deep-Sea Research II*. **1995**, 42, 215.
- Jansen, R. A. G.; van Leeuwen, H. P.; Cleven, R. F. M. J.; van den Hoop, M. A. G. T. Speciation and lability of Zn(II) in river waters. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, 32, 3882.
- Knauer, K.; Ahner, B.; Xue, H. B.; Sigg, L. Metal and phytochelatin content in phytoplankton from freshwater lakes with different metal concentrations. *Environ. Toxic. and Chem.* **1998**, 17, 2444.
- Knauer, K.; Behra, R.; Sigg, L. Effects of free  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  ions on growth and metal accumulation in freshwaters algae. *Environ. Toxic. and Chem.* **1997**, 16, 220.
- LexEngel, V.; Poggiani, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. *Rev. Bras. Fisiol. Vegetal*, **1991**, 3, 39.
- Locatelli, C. Heavy metals in matrices of food interest: Sequential voltammetric determination at trace and ultratrace level of copper, lead, cadmium, zinc, arsenic, selenium, manganese and iron in meals. *Electroanalysis*. **2004**, 16, 1478.
- Locatelli, C.; Torsi, G. Voltammetric trace metal determinations by cathodic and anodic stripping voltammetry in environmental matrices in the presence of mutual interference. *J. of Electroanalytical Chem.* **2001**, 509, 80.
- Lombardi, A. T.; Hidalgo, T. M. R.; Vieira, A. A. H. Copper complexing properties of dissolved organic materials exuded by the freshwaters microalgae *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae). *Chemosphere*. **2005**, 60, 453.
- Lombardi, A. T.; Vieira, A. A. H. Copper Complexation by Cyanophyta and Chlorophyta exudates. *Phycologia*. **2000**, 39, 118.
- Lombardi, A. T.; Vieira, A. A. H. Lead and Copper Complexing extracellular ligands released by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales, Chlorophyta). *Phycologia*. **1999**, 38, 283.
- Lombardi, A. T.; Vieira, A. A. H., Sartori, L. A. Mucilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales). *J. of Phycology*. **2002**, 38, 332.
- Lu, Y.; Allen, H. E. Partitioning of copper onto suspended particulate matter in river waters. *Sci. Tot. Environ.* **2001**, 277, 119.

- Mendiguchía, C.; Moreno, C.; Galindo-Riaño, M. D.; García-Vargas M. Using chemometric tools to assess anthropogenic effects in river water. A case study: Guadalquivir River (Spain). *Analytica Chimica Acta*. **2004**, 515, 143.
- Meylan, S.; Behra, R.; Sigg, L. Accumulation of copper and zinc in periphyton in response to dynamic variations of metal speciation in freshwater. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, 37, 5204.
- Meylan, S.; Odzak, N.; Behra, R.; Sigg, L. Speciation of copper and zinc in natural freshwater: comparison of voltammetric measurements, diffusive gradients in thin films (DGT) and chemical equilibrium models. *Anal. Chim. Acta*. **2004**, 510, 91.
- MineqL+. Disponível on-line em <http://mineql.com>. Data de acesso: 30/07/2005.
- Muller, F. L. L.; Gulin, S. B.; Kalvøy, A. Chemical speciation of copper and zinc in surface waters of the western Black Sea. *Mar. Chem.* **2001**, 76, 233.
- Muller, F. L. L. Interactions of copper, lead and cadmium with the dissolved, colloidal and particulate components of estuarine and coastal waters. *Mar. Chem.* **1996**, 52, 245.
- Murray, A. P.; Gibbs, C. F.; Longmore, A. R. Determination of chlorophyll in marine waters: intercomparison of a rapid HPLC method with full HPLC, spectrophotometric and fluorometric methods. *Mar. Chem.* **1986**, 19, 211.
- Mylon, S. E.; Twining, B. S.; Fisher, N. S.; Benoit, G. Relating the speciation of Cd, Cu, and Pb in two connecticut rivers with their uptake in algae. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, 37, 1261.
- Noël, S.; Tercier-Waeber, M.-L.; Lin, L.; Buffle, J. Complexing gel integrated microelectrode arrays for direct detection of free metal ion concentrations in natural waters. *J. Phys. I* **2003**, 107, 965.
- Nriagu, J. O. Human influence on the global cycling of trace-metals. *Global Plan. Change*. **1990**, 82, 113.
- Nriagu, J. O.; Pacyna. A. Global assessment of worldwide contamination of air, water, and soils with trace metals. *Nature*. **1988**, 333, 134.
- Odum, E. P. *Ecologia*. Rio de Janeiro. Editora Guanabara koogan S.A., **1988**.
- Omanovic, D.; Pizeta, I.; Peharec, Z.; Branica, M. Voltammetric determination of the metal complexing capacity in model solutions. *Mar. Chem.* **1996**, 53, 121.
- Parsons, T.R.; Maita, Y.; Lalli, M.C. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis, **1984**.

- Perdue, E. M.; Reuter, J. H.; Ghosal, M. The operational nature of acidic functional group analyses and its impact on mathematical descriptions of acid-base equilibria in humic substances. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **1980**, *44*, 1841.
- Pothro, M. G. Memorandum: Office of Water Policy and Technological Guidance on interpretation and implementation of aquatic life metals criteria. U.S.EPA, Washington DC, **1993**.
- Round, F. E. *Biologia das algas*. Rio de Janeiro. Guanabara, 2ed., **1983**.
- Ruzic, I. Theoretical aspects of the direct titration of natural waters and its information yield for trace metal speciation. *Anal. Chim. Acta.* **1982**, *140*, 99.
- Ruzic, I. Trace metal complexation at heterogeneous binding sites in aquatic systems. *Mar. Chem.* **1996**, *53*, 1.
- Salaun, P.; Bujard, F.; Berdondini, L.; Koudelka-Hep, M.; Buffle, J. Integrated microanalytical system coupling permeation liquid membrane and voltammetry for trace metal speciation. Technical description and optimization. *Electroanalysis*. **2004**, *16*, 811.
- Sartory, D. P. The determination of algal chlorophyllous pigments by high performance liquid chromatography and spectrophotometry. *Water Res.* **1985**, *19*, 605.
- Scarano, G.; Bramanti, E.; Zirino, A. Determination of copper complexation in sea water by a ligand competition technique with voltammetric measurement of the labile metal fraction. *Anal. Chim. Acta.* **1992**, *264*, 153.
- Scarponi, G.; Capodaglio, G.; Barbante, C.; Cescon, P. The Anodic Stripping Voltammetric Titration Procedure for Study of Trace Metal Complexation in Sea Water. *Element Speciation in Bioinorganic Chemistry*, Sergio Caroli (Ed.). Nova Iorque. Chemical Analysis Series, Vol. 135. John Wiley & Sons, **1996**.
- Sigg, L. Partitioning of metals to suspended particles. *In*: Allen, H. E.; Garrison, A. W.; Luther III, G W. (Ed), *Metals in surface waters*. Ann Arbor Press, Chelsea, p221-239, **1998**.
- Sigg, L. Regulation of trace elements in lakes: The role of sedimentation. *In*: Buffle, J.; De Vitre, R. R. (Ed), *Chemical and Biological Regulation of Aquatic Systems*. CRC Press, Boca Raton, p177-197, **1994**.
- Silva, M. R. C.; Honório, K. M.; Brigante, J.; Espíndola, E. L. G.; Vieira, E. M.; Gambardella, M. T. P.; Silva, A. B. F. A Chemometric study on the

- accumulation of heavy metals along the Mogi Guaçu river basin. *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, 16, 1104.
- Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.; Princípios de Análise Fundamental. Bookman, 5ed., **2002**.
- Sodré, F. F.; Anjos, V. E.; Prestes, E. C.; Grassi, M.T. Identification of copper sources in urban surface waters using principal component analysis based on aquatic parameters. *J. Environ. Monit.* **2005**, 7, 581.
- Sodré, F. F.; Grassi, M. T. Copper speciation in Iguaçu river basin, at Curitiba's metropolitan region, Brazil, by ligand competition using DPASV. *J. Phys. IV France.* **2003**, 107, 1283.
- Sodré, F. F.; Peralta-Zamora, P. G.; Grassi, M. T. Digestão fotoquímica, assistida por microondas, de águas naturais: aplicação em estudos de partição e especiação do cobre. *Quim. Nova.* **2004**, 27, 695.
- Stevenson, R. J.; Bothwell, M. L.; Lowe, R. L. Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems. Edition United Kingdom, E.U.A. **1996**.
- Stumm, W.; Chemistry of the solid water interface – processes at the mineral-water and particle-water-interface in natural systems. Nova Iorque. John Wiley & Sons, **1992**.
- Stumm, W.; Morgan, J. J.; Aquatic Chemistry – Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters. Nova Iorque. John Wiley & Sons, 3ed., **1996**.
- Tavares, T. M.; Carvalho, F. M. Avaliação da exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplo do recôncavo baiano. *Quim. Nova.* **1992**, 15, 147.
- Tchobanoglous, G.; Burton, F. L. Wastewater engineering: treatment, disposal, and reuse. Nova Iorque, Metcalf & eddy Inc. McGrall Hill, **1991**.
- Temminghoff, E. J. M.; Plette, A. C. C.; van Eck, R.; van Riemsdijk, W. H. Determination of the chemical speciation of trace metals in aqueous systems by the Wageningen Donnan membrane technique. *Anal. Chim. Acta.* **2000**, 417, 149.
- Templeton, D. M.; Ariese, F.; Cornelis, R.; Danielsson, L. G.; Muntau, H.; van Leeuwen, H. P.; Łobiński, R. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. *Pure Appl. Chem.* **2000**, 72, 1453.
- Tien, C. J. Biosorption of metal ions by freshwater algae with different surface characteristics. *Process Biochemistry.* **2002**, 38, 605.

- Twiss, M. R.; Errécalde, O.; Fortin, C.; Campbell, P. G. C.; Jumarie, C.; Denizeau, F.; Berkelaar, E.; Hale, B.; van Rees, K. Coupling the use of computer chemical speciation models and culture techniques in laboratory investigations of trace metal toxicity. *Chem. Spec. Bioavail.* **2001**, 13, 9.
- Twiss, M. R.; Errécalde, O.; Fortin, C.; Campbell, P. G. C.; Jumarie, C.; Denizeau, F.; Berkelaar, E.; Hale, B.; van Rees, K. Guidelines for studies of metal bioavailability and toxicity – why metal speciation should be considered and how! Canadian Network of Toxicology Centres (CNTC). Metal Speciation Theme Team, versão 6, 21/03/**2000**.
- Twiss, M. R.; Moffett, J. W. Comparison of copper speciation on coastal marine waters measured using analytical voltammetry and diffusion gradient in thin-film techniques. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, 36, 1061.
- U.S.EPA, Interim guidance on interpretation and implementation of aquatic life criteria for metals. Washington DC, **1992**.
- U.S. EPA; Method 1669 - Sampling ambient water for determination of trace metals at EPA Water Quality Criteria level. Office of Science and Technology Eng. And Analysis Division. Washington, EUA, **1994**.
- U.S.EPA. Method 1669 - Sampling ambient water for determination of trace metals at EPA Water Quality Criteria level. Washington DC, **1996**.
- van den Berg, C. M. G.; Kramer, J. R. Determination of complexing capacities of ligands in natural waters and constants of conditional stability constants of copper complexes by means of manganese dioxide. *Anal Chim. Acta.* **1979**, 106, 113.
- van Hullebusch, E.; Chatenet, P.; Deluchat, V.; Chazal, P. M.; Froissard, D.; Botineau, M.; Ghestem, A.; Baudu, M. Copper accumulation in a reservoir ecosystem following copper sulfate treatment (St. Germain Les Belles, France). *Water, Air, and Soil Pollution.* **2003**, 150, 3.
- van Leeuwen, H. P. V.; Town, R. M.; Buffle, J.; Cleven, R. F. M. J.; Davison, W.; Puy, J.; Riemsdijk, W. H. V.; Sigg, L. Dynamic speciation analysis and bioavailability of metals in aquatic systems. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, 39, 8545.
- van Leeuwen, H. P.; Town, R. M. Kinetic limitations in measuring stabilities of metal complexes by competitive ligand exchange - adsorptive stripping voltammetry (CLE-AdSV). *Environ. Sci. Technol.* **2005**, 39, 7217.

- van Leeuwen, H. P.; Town, R. M. Stripping chronopotentiometry at scanned deposition potential (SSCP). Part 1. Fundamental features. *J. Electroanal. Chem.* **2002**, 536, 129.
- Vega, M.; Pardo, R.; Barrado, E.; Debán, L. Assessment of seasonal and polluting effects on the quality of river water by exploratory data analysis. *Water Res.* **1998**, 32, 3581.
- Velasquez, I.B.; Jacinto, G.S.; Valera, F.S. The speciation of dissolved copper, cadmium and zinc in Manila bay, Philippines. *Marine Pollution Bulletin.* **2002**, 45, 210.
- Verbanck, M.; Vanderborght, J. P.; Wollast, R. Major ion content of urban wastewater: an assessment of per capita loading. *Res. J. Water Pollut Control Fed.* **1994**, 61, 1722.
- Weng, L. P.; van Riemsdijk, W. H.; Temminghoff, E. J. M. Kinetic aspects of Donnan membrane technique for measuring free trace cation concentration. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 2852.
- Witters, H. E. Chemical speciation dynamics and toxicity assessment in aquatic systems, *Ecotoxicol. Environ. Safety.* **1998**, 41, 90.
- Xue, H. B.; Gachter, R.; Sigg, L. Comparison of Cu and Zn cycling in eutrophic lakes with oxic and anoxic hypolimnion. *Aquat.sci.* **1997**, 59, 176.
- Xue, H. B.; Sigg, L. Binding of Cu(II) to algae in a metal buffer. *Wat. Res.* **1990**, 24, 1129.
- Xue, H. B.; Sigg, L. Cadmium speciation and complexation by natural organic ligands in fresh water. *Anal. Chim. Acta.* **1998**, 363, 249.
- Xue, H. B.; Sigg, L. Free cupric ion concentration and Cu(II) speciation in a eutrophic lake. *Limnol. Oceanogr.* **1993**, 38, 1200.
- Xue, H. B.; Sigg, L. Zinc speciation in lake waters and its determination by ligand exchange with EDTA and differential pulse anodic stripping voltametry. *Anal. Chim. Acta.* **1994**, 284, 505.
- Xue, H.; Kistler, D.; Sigg, L. Competition of copper and zinc for strong ligands in a eutrophic lake. *Limnol. Oceanogr.* **1995**, 40, 1142.
- Yabe, M. J. S.; Oliveira, E. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. *Quim. Nova.* **1998**, 21, 551.



Zhang, H.; Davison, W. Direct *in situ* measurements of labile inorganic and organically bound metal species in synthetic solutions and natural waters using diffusive gradients in thin films. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 4447.

Zsolnay, A. Dissolved organic matter: artifacts, definitions, and functions. *Geoderma.* **2003**, 113, 187.

## **ANEXO**

		Jun04	Jul04	Ago04	Set04	Out4	Nov04	Dez04	Jan05	Fev05	Mar05	Abr05	Mai05
Parâmetros (Variáveis)	Unidade	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 Cloreto	mg L <sup>-1</sup>	5,3	8,1	7,1	5,7	5,6	5,5	5,1	4,8	5,3	5,9	5,2	5,3
2 Temperatura Ambiente	°C	15	10	17	22	23	18	22	23	26	25	28	23
3 Temperatura da Água	°C	17,3	14,7	18,1	20,7	19,9	20,3	22,8	25,3	26,7	24,6	25,4	22,0
4 Clorofila-a	µg L <sup>-1</sup>	17,78	21,43	19,11	22,30	29,96	33,60	29,57	9,680	5,650	16,17	11,84	14,55
5 Nível de Água do Reservatório	m	3,10	3,17	3,40	2,80	2,90	3,02	3,30	3,22	3,08	3,20	3,08	3,00
6 pH	-	6,9	7,1	7,5	7,4	7,4	7,4	7,2	7,5	7,5	7,1	7,3	7,0
7 Oxigênio Dissolvido	mg L <sup>-1</sup>	11,7	5,30	7,20	9,65	6,50	5,70	7,65	7,35	7,30	6,00	7,00	8,50
8 Carbono Orgânico Dissolvido	mg L <sup>-1</sup>	12,4	4,14	4,13	4,13	4,95	15,7	5,29	7,87	5,01	7,59	4,95	10,8
9 Sólidos Suspensos Totais	mg L <sup>-1</sup>	8,20	7,95	7,83	11,3	13,6	9,27	13,2	6,24	2,58	5,45	4,72	9,41
10 Alcalinidade	mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup>	13,9	15,8	16,8	18,4	13,7	15,4	15,3	15,8	15,3	14,7	12,9	12,6
11 Cobre Total Recuperável	nmol L <sup>-1</sup>	21,60	29,89	24,39	24,90	11,12	22,02	16,62	26,27	16,15	20,53	14,31	17,42
12 Cobre Total Dissolvido	nmol L <sup>-1</sup>	16,20	19,98	14,00	24,40	9,170	20,58	14,97	20,00	15,28	19,47	10,89	15,11
13 Zinco Total Recuperável	nmol L <sup>-1</sup>	45,20	66,63	45,10	47,60	63,80	49,58	52,11	51,49	44,01	93,29	133,6	96,81
14 Zinco Total Dissolvido	nmol L <sup>-1</sup>	31,90	61,60	44,60	42,40	62,57	46,83	49,58	49,91	31,28	59,65	119,6	92,84
15 Cobre Complexado	nmol L <sup>-1</sup>	15,46	18,04	13,40	22,68	8,430	16,66	14,26	14,11	9,787	17,74	3,792	10,61
16 Zinco Complexado	nmol L <sup>-1</sup>	28,00	58,62	42,64	23,30	34,17	40,97	47,51	47,93	29,73	52,90	36,80	83,63
17 Cobre Lábil	nmol L <sup>-1</sup>	0,760	1,941	0,594	1,711	0,742	3,917	0,706	5,897	5,494	1,733	7,106	4,498
18 Zinco Lábil	nmol L <sup>-1</sup>	3,800	3,100	1,998	19,08	28,39	5,866	2,070	1,977	1,543	6,753	82,75	9,208
19 Cobre Livre	nmol L <sup>-1</sup>	0,79	0,51	0,30	0,86	0,19	1,0	0,52	0,67	0,51	0,79	1,6	3,4
20 Zinco Livre	nmol L <sup>-1</sup>	5,84	2,87	2,11	9,17	14,3	3,27	2,59	3,12	1,63	3,21	98,0	34,0
21 [L] <sub>TOTAL</sub> Cobre	nmol L <sup>-1</sup>	199,8	227,3	327,0	158,3	192,7	51,68	324,6	143,6	169,9	127,6	119,9	142,88
22 [L] <sub>TOTAL</sub> Zinco	nmol L <sup>-1</sup>	294,0	283,2	181,0	198,9	410,0	278,7	197,2	252,0	303,2	272,2	155,5	278,0
23 Log K' Cobre	-	7,99	8,22	7,95	7,95	8,26	8,05	7,85	7,65	7,58	8,25	7,32	8,05
24 Log K' Zinco	-	7,22	7,96	8,16	7,33	6,96	7,75	8,08	7,86	7,82	7,91	7,00	7,75
25 Log K <sub>D</sub> Cobre	-	4,603	4,795	4,976	3,300	4,193	3,877	3,921	4,701	4,343	4,001	4,823	4,210
26 Log K <sub>D</sub> Zinco	-	4,706	3,780	3,047	4,033	3,161	3,801	3,585	3,707	5,198	5,015	4,397	3,657

